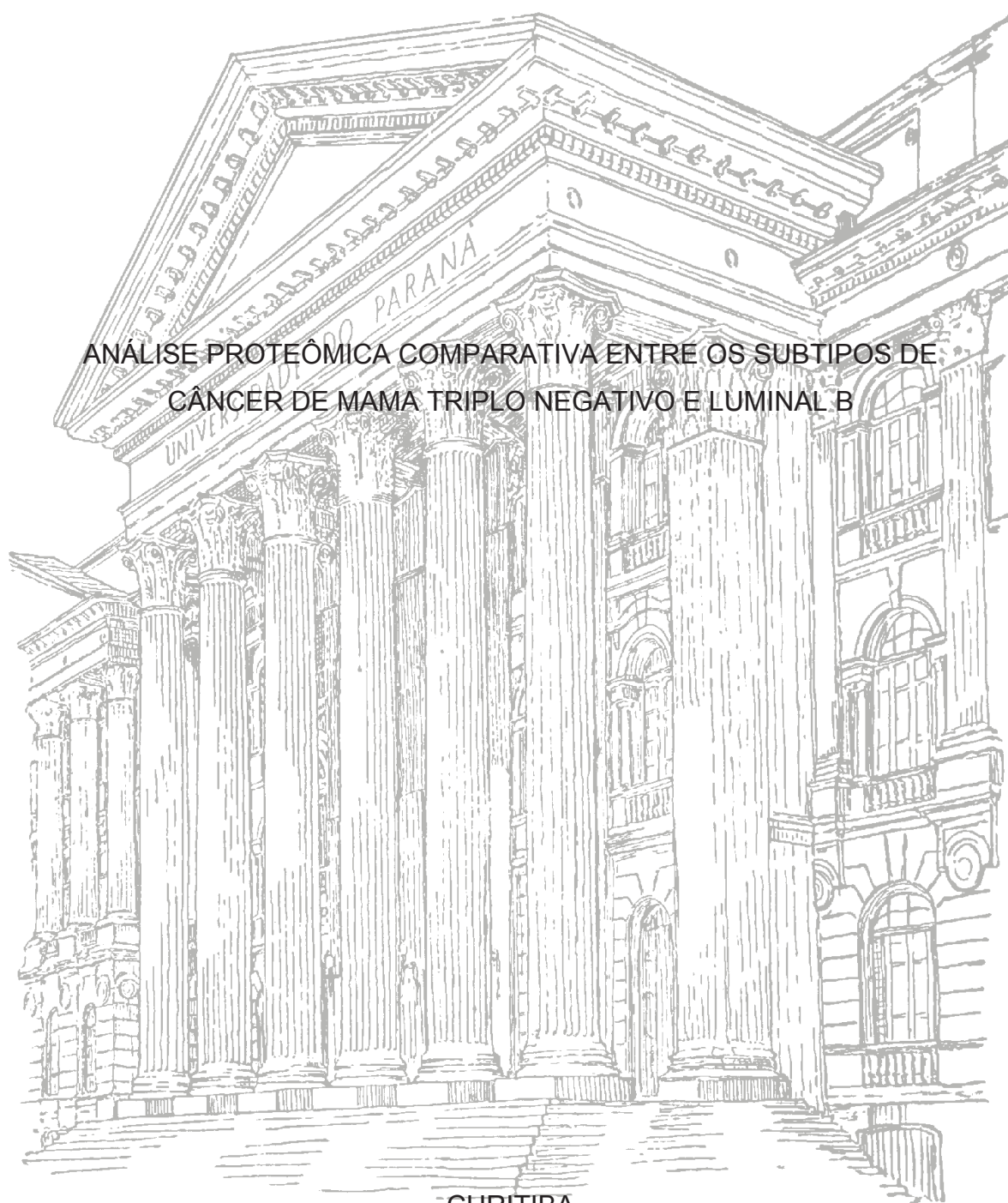


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA ALINE DOS SANTOS DE SOUZA



CURITIBA

2020

BRUNA ALINE DOS SANTOS DE SOUZA

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE OS SUBTIPOS DE  
CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli  
Co-orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro e Dra. Talita Helen Bombardelli Gomig

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Souza, Bruna Aline dos Santos de.

Análise proteômica comparativa entre os subtipos de câncer de mama triplo negativo e Luminal B. / Bruna Aline dos Santos de Souza. – Curitiba, 2020.

97 f. : il.

Orientador: Iglenir João Cavalli.

Coorientadora: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro.

Coorientadora: Talita Helen Bombardelli Gomig.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Mamas - Câncer. 2. Proteômica. 3. Marcadores biológicos. 4. Mamas - Tumores. I. Título. II. Cavalli, Iglenir João. III. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca. IV. Gomig, Talita, Helen Bombardelli. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 615.82

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BRUNA ALINE DOS SANTOS DE SOUZA** intitulada: **Análise proteômica comparativa entre os subtipos de câncer de mama triplo negativo e Luminal B**, sob orientação do Prof. Dr. IGLENIR JOÃO CAVALLI que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.


A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 11 de Março de 2020.



IGLENIR JOÃO CAVALLI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



ADRIANA FROELICH MERCADANTE

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA)



ANA CLAUDIA BONATTO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Dedico esse trabalho as duas mulheres que me ensinaram a crescer, lutar e sempre almejar novos horizontes. Minha mãe Dilceia dos Santos (in memory), pela sua coragem ao enfrentar o câncer em tempos onde o tratamento exigia muito do físico e do mental e a minha tia Janete dos Santos (in memory), pela determinação, luta e coragem ao não se deixar abater. Vocês foram e sempre serão minha inspiração.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus orientadores, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro e Dra. Talita Helen Bombardelli Gomig, por todo o incentivo, amizade e dedicação durante esse período de orientação e formação.*

*A todos os amigos e colegas do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, pela convivência, momentos de construção acadêmica, sorrisos de incentivo e momentos de alegria. Muito obrigada.*

*A todos os colegas envolvidos no processo experimental, em particular ao Tobias por estar sempre disposto e a Ingrid pelas conversas e dicas sobre o experimento. Obrigada.*

*Ao meu amigo e colega de laboratório Alexandre Luiz Korte de Azevedo, pela ajuda com os experimentos de bancada e in silico, por dividir momentos de preocupação, alegrias e vitórias. Muito obrigada por tudo!*

*Aos meus amigos pelos incentivos, apoio nos momentos mais difíceis e por não me deixarem desistir desse meu objetivo, aos que me viram chorar e me mostraram que sem luta não há vitória. Meu sincero obrigada.*

*A todos meus amigos e colegas de trabalho, pela compreensão e auxílio nos momentos que mais foi preciso*

*A minha família, minha principal inspiração, em especial a minha irmã Jessica Caroline pelo apoio ímpar emocional e por dividir todas as lutas de uma vida. Muito obrigada por tudo!*

*À todas as instituições envolvidas nesta pesquisa, e à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.*

*“Na sobrevivência de indivíduos e raças favorecidas, durante a permanente luta da renovação da existência é que percebemos a forma e o imensurável poder da seleção natural.”*

*Charles Darwin, biólogo, 1859.*

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil é o segundo mais frequente (superado pelo de pele não melanoma). A heterogeneidade tumoral dessa neoplasia é uma das dificuldades que interferem na terapêutica precisa e consequentemente no prognóstico da doença. A imunohistoquímica classifica os tumores em subgrupos orientando a utilização do melhor tratamento. A utilização de biomarcadores é fundamental para uma classificação mais apropriada desta doença, considerando inclusive a facilidade de obtenção de amostras em fluidos, como sangue e biópsia, para a identificação de potenciais marcadores evidenciando a importância de estudos nessas amostras biológicas. Métodos proteômicos podem auxiliar na identificação de proteínas com alterações no perfil de expressão entre amostras biológicas distintas. Neste contexto, o presente estudo tem por objetivo obter o proteoma de tecidos mamários não tumorais: do tumor primário de mama (T) de pacientes diagnosticados com diferentes subtipos moleculares de câncer de mama (Triplo Negativo e Luminal B) para avaliar diferenças significativas na expressão proteica, de relevância na discriminação destes subtipos da doença. As amostras de tecidos mamários não tumorais, do tumor primário de mama e do linfonodo axilar metastático foram previamente processadas e preparadas para a espectrometria de massas e, em seguida, foram efetuadas a análise comparativa, a validação das proteínas e a anotação funcional. As comparações foram entre proteínas presentes entre subtipos (Triplo Negativo e Luminal B), a análise das proteínas diferencialmente expressas foi obtida através de testes estatísticos não paramétricos *in-silico* e a validação por técnicas moleculares. A anotação funcional das proteínas diferencialmente expressas e a predição de suas interações permitiu a seleção de alvos de interesse para o estudo do câncer de mama. Proteínas que apresentaram relevância funcional na tumorigênese e que constituam potenciais marcadores para a discriminação entre os subtipos foram avaliadas na literatura e em bancos de dados de interação proteica, sendo elas a Culina 3,  $\beta$ -catenina1 e Fibronectina 1. A validação da expressão proteica foi realizada através do método *Western Blotting*, demonstrando a expressão diferencial dessas proteínas entre subtipos distintos do câncer mama, a qual pode ter importância na progressão da doença, principalmente no que se refere a migração celular e invasão. Estudos adicionais envolvendo suas interações com outras proteínas poderão ampliar a compreensão das funções desempenhadas por essas proteínas no contexto do câncer de mama triplo negativo, evidenciando seu potencial como marcadores moleculares da doença.

**Palavras chave:** Câncer de mama, Proteômica, Triplo Negativo, Luminal B.



## ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer among women in the world and in Brazil is the second most frequent (surpassed by non-melanoma skin). The tumor heterogeneity of this neoplasm is one of the difficulties that interfere in the therapy accurately and consequently in the prognosis of the disease. Immunohistochemistry classifies tumors into subgroups guiding the use of the best treatment. The use of biomarkers is fundamental for a more appropriate classification of this disease, including considering the ease of obtaining samples in fluids, such as blood and biopsy, for the identification of potential markers evidencing the importance of studies in these biological samples. Proteomic methods can help identify proteins with changes in the expression profile between distinct biological samples. In this context, the present study aims to obtain the proteoma of non-tumor breast tissues: the primary breast tumor (T) of diagnosed patients with different molecular subtypes of breast cancer (Triple Negative and Luminal B) to evaluate significant differences in protein expression, of relevance in the discrimination of these subtypes of the disease. Samples of non-tumor breast tissues, primary breast tumor and metastatic axillary lymph node were previously processed and prepared for mass spectrometry and then comparative analysis, protein validation and functional annotation. The analysis of differentially expressed proteins was obtained through in-silic nonparametric statistical tests, and validation by molecular techniques, comparisons were between proteins present between subtypes (Triple Negative and Luminal B). Functional annotation of differentially expressed proteins and the prediction of their interactions allowed the selection of targets of interest for the study of breast cancer. Proteins that presented functional relevance in tumorigenesis and that constitute potential markers for discrimination between subtypes were evaluated in the literature and in protein interaction databases, which are Culina 3,  $\beta$ -catenine1 and Fibronectin 1. Protein expression validation was performed using the Western Blotting method, demonstrating the differential expression of these proteins among distinct subtypes of breast cancer, which may be important in the progression of the disease, especially with regard to cell migration and invasion. Additional studies involving their interactions with other proteins may broaden the understanding of the functions performed by these proteins in the context of triple negative breast cancer, evidencing its potential as molecular markers of the disease.

**Keywords:** Breast Cancer, Proteomics, Triple Negative, Luminal B

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - <i>HALLMARKS</i> DO CÂNCER.....	22
FIGURA 2 - PROGRESSÃO CELULAR DO CÂNCER.....	23
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA MAMA SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA.....	25
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE ANÁLISE DE DADOS NO PROGRAMA PERSEUS V 1.6.2.2.....	46
FIGURA 5 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS PRESENTES DA COMPARAÇÃO T <sub>TN</sub> XT <sub>LB</sub> E A MIGRAÇÃO CELULAR.....	63
FIGURA 6 - REDE DE INTERAÇÃO PROTEICA - CTNNB1.....	66
FIGURA 7 - REDE DE INTERAÇÃO PROTEICA - FN1.....	67
FIGURA 8 - REDE DE INTERAÇÃO PROTEICA - CUL3.....	68
FIGURA 9 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA $\beta$ -CATENINA EM TECIDOS E LINHAGENS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B.....	70
FIGURA 10 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FIBRONECTINA 1 EM TECIDOS E LINHAGENS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL.....	72
FIGURA 11 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CULINA 3 EM TECIDOS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL E LINHAGENS DO SUBTIPO TRIPLO NEGATIVO.....	74

## LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA.....	28
TABELA 2 - DESCRIÇÃO DAS INFORMAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DAS PACIENTES.....	38
TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS TECIDOS $T_{TN}$ X $T_{LB}$ .....	47
TABELA 4 - VIAS BIOLÓGICAS RELACIONADA COM AS PROTEÍNAS SELECIONADAS PARA VALIDAÇÃO.....	52
TABELA 5 - RELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS PARA VALIDAÇÃO E AS CARACTERÍSTICAS DO CÂNCER.....	56
TABELA 6 - GENES DE PREDIÇÃO DE ATIVAÇÃO.....	59
TABELA 7 - RELAÇÃO PROTEÍNA X BIOMARCADORES PREDITOS .....	62

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO1. ABUNDÂNCIA RELATIVA DA PROTEÍNA $\beta$ -CATENINA EM TECIDOS E LINHAGENS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B.....	70
GRÁFICO 2. ABUNDÂNCIA RELATIVA DA PROTEÍNA FIBRONECTINA 1 EM TECIDOS E LINHAGENS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B.....	72
GRÁFICO 3. ABUNDÂNCIA RELATIVA DA PROTEÍNA CULINA 3 EM TECIDOS E LINHAGENS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B.....	75

## APÊNDICES

APÊNDICE 1- VIAS CANÔNICAS E A RELAÇÃO COM AS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS.....	92
APÊNDICE 2. FIGURA GERAL DAS 22 PROTEÍNAS REALIZADAS NO STRING.....	93
APÊNDICE 3 GÉIS DE $\beta$ - CATENINA 1 TECIDO E LINHAGEM .....	94
APÊNDICE 4 GÉIS DE CULINA 3 TECIDO E LINHAGEM .....	95
APÊNDICE 5 GÉIS DE FIBRONECTINA 1 TECIDO E LINHAGEM.....	96

## LISTAS ABEVIATURAS E SIGLAS

CDI - Carcinoma Ductal Invasivo

CTNNB1 - Proteína  $\beta$ - catenina

CUL3 - Proteína Cullin3

DAVID - *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*

(Banco de dados para anotação, visualização e descoberta integrada)

EGFR - *Epidermal growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento epidérmico)

ESI - *Electrospray Ionization* (ionização por eletrospray)

FN1 - Proteína Fibronectina 1

GO - *Gene Ontology* (Ontologia do gene)

GSEA - Enriquecimento funcional de conjunto de genes

HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2* (Receptor-tipo 2 do Fator de crescimento epidérmico humano)

HPLC - *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

IHC - imunoistoquímica

IPA - *Ingenuity Canonical Pathways*

Ki-67 - Marcador de proliferação celular Ki-67

L - Linfonodo axilar metastático

LumB - Luminal B

MS – *Mass spectrometry* (espectrometria de massa)

MS/MS – Espectrometria de massa em *tandem*

MSigDB v. 6.2 - Banco de dados de assinaturas moleculares

Na - Adjacente ao tumor

Na<sub>LB</sub> - Tecido adjacente ao tumor do subtipo Luminal B

Na<sub>TN</sub> - Tecido adjacente ao tumor do subtipo Triplo Negativo

Nct – Tecido contralateral ao tumor

Nct<sub>LB</sub> - Tecido contralateral ao tumor do subtipo Luminal B

Nct<sub>TN</sub> - Tecido contralateral ao tumor do subtipo Triplo Negativo

PARP - Poli-ADP-ribose

RE – Receptor de Estrogênio

RP – Receptor de Progesterona

STRING - *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes* (Ferramenta de pesquisa para a recuperação de genes em interação)

T - Tumor primário de mama

T<sub>LB</sub> - Tecido tumoral do subtipo Luminal B

TN - Triplo negativo

T<sub>TN</sub> - Tecido tumoral do subtipo Triplo Negativo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>21</b>
2.1 O CÂNCER DE MAMA .....	21
2.2 TUMORIGÊNESE .....	22
2.3 HETEROGENEIDADE DO CÂNCER DE MAMA.....	24
2.3.1 Classificação Histológica.....	24
2.3.2 Classificação Molecular.....	25
2.3.2.1 Tumores Receptores de Estrógeno positivos.....	26
2.3.2.2 Tumores Receptores de Estrógeno negativos.....	27
2.3.3 Classificação imunoistoquímica.....	29
2.3.4 Os subtipos moleculares do câncer de mama: Triplo Negativo x Luminal B.....	30
2.3.4.1 O subtipo Luminal B.....	30
2.3.4.2 O subtipo Triplo Negativo.....	30
2.4 PROTEÔMICA .....	32
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>38</b>
5.1 AMOSTRAS.....	38
5.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	38
5.3 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS.....	39
5.4 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS E PREDIÇÃO DE INTERAÇÕES PROTEICAS.....	40
5.5 VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS DE INTERESSE E DAS INTERAÇÕES PROTEICAS.....	41
5.5.1 Western Blotting- Géis para corrida.....	41
5.5.1.1 Amostras de Tecido.....	42
5.5.1.2 Amostras de Linhagem.....	42
5.5.2 Western Blotting- Transferências.....	43
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>



6.1 IDENTIFICAÇÃO DO PROTEOMA DIFERENCIAL ENTRE OS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B.....	45
6.2 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS ENTRE OS TUMORES TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B.....	52
6.2.1 Vias biológicas e sua relação com as proteínas diferencialmente expressas.....	52
6.2.2 Características do câncer e a relação com as proteínas diferencialmente expressas.....	56
6.2.3 Reguladores <i>Upstream</i> e relação com as proteínas diferencialmente expressas.....	59
6.2.4 Biomarcadores preditos e as proteínas diferencialmente expressas.....	61
6.2.5 Relação das proteínas diferencialmente expressas e a migração celular.....	63
6.3 PREDIÇÕES DE INTERAÇÃO PROTEICA.....	65
6.3.2 Proteína $\beta$ - catenina 1 CTNNB1.....	65
6.3.1 Proteína Fibronectin 1 FN1.....	66
6.3.3 Proteína Cullin 3 CUL3.....	67
6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS PROTEÍNAS $\beta$ -CATENINA 1, FIBRONECTINA 1 E CULINA 3 NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B .....	69
6.4.1 Avaliação da expressão de $\beta$ -Catenina 1 em tumores TN e LB.....	69
6.4.2 Avaliação da expressão de Culina 3 em tumores TN e LB.....	72
6.4.3 Avaliação da expressão de Fibronectina 1 em tumores TN e LB.....	74
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2020) o câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no Brasil (exceto o de pele não melanoma), e no mundo, sendo menos comum em mulheres com menos de 40 anos de idade. A partir dos 50 anos de idade o risco cresce exponencialmente. Para o Brasil estimam-se 66.280 casos novos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2020-2021, com um risco estimado de 68,78 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2020) a cada ano 9,6 milhões de pessoas morrem de câncer, com uma parcela significativa delas por câncer de mama. Estas mortes, não são causadas principalmente pelo tumor primário e sim por suas metástases (GUNASINGHE et al., 2012, INCA, 2020).

A progressão tumoral, com a invasão adjacente e posteriormente o desenvolvimento de metástases mamárias, evidencia a necessidade de identificação de marcadores moleculares capazes de predizer precocemente o estadiamento do câncer, ao longo de sua progressão.

Biomarcadores proteicos geralmente estão presentes em fluidos (como no sangue) e na massa tumoral, evidenciando a importância de estudos nessas amostras biológicas (TYANOVA et al., 2016)

Tumores mamários apresentam relevante heterogeneidade, requerendo um eficiente conhecimento molecular de sua composição para se estabelecer uma lógica terapêutica adequada (HUANG et al., 2014). A heterogeneidade tumoral do câncer de mama confere a esta neoplasia uma dificuldade em seu diagnóstico e, acima de tudo, um desafio no sentido de prever seu comportamento, terapia e prognóstico. A classificação histopatológica, dos tumores mamários usada de forma isolada tem menor valor preditivo. A associação entre a histologia e a classificação por meio da imunoistoquímica, pode determinar de forma mais eficaz o subtipo do câncer mamário, orientando a utilização do tratamento e obtendo a melhor resposta terapêutica (CARMO et al., 2016).

Perou et al., (2000) inicialmente descreveram quatro subtipos, sendo o luminal classificado como um único subtipo. Nesta classificação inicial identificava-se: luminal/ RE+, correspondente à linhagem luminal; tipo basal

(*basal-like*), podendo incluir a linhagem mioepitelial; HER2+, com superexpressão de HER2; e semelhante ao normal (*normal-like*). Em seguida, SORLIE et al. (2001; 2003) distinguiram o subtipo luminal em luminal A (tumores de baixo grau, RP+ e HER2-) e B (tumores de grau elevado, RP+/-, HER2+/- e alto grau de Ki-67)

A complexidade do câncer de mama está presente em diversos níveis moleculares, incluindo o genômico, transcriptômico e proteômico (JACQUEMIER, 2005). As interações de moléculas efetoras, incluindo as proteínas, podem impactar em vias de sinalização e demais interações moleculares, contribuindo para a iniciação e progressão da tumorigênese mamária (GOLDHIRSCH, 2011).

A espectrometria de massas de alta *performance* tem possibilitado vários avanços na análise proteômica, fornecendo algoritmos computacionais e métodos bioquímicos, os quais, em combinação com métodos computacionais avançados, permitem uma cobertura proteômica de alta confiabilidade na identificação de proteínas (TYANOVA et al., 2016). Com isso, as tecnologias proteômicas têm fornecido uma plataforma sólida para aplicação de pesquisa proteômica em larga escala envolvendo os subtipos moleculares do câncer (BARBOSA, 2012).

A identificação de biomarcadores relacionados ao câncer de mama pode auxiliar no diagnóstico precoce sem a necessidade de procedimentos demasiadamente invasivos. Tyanova et al.(2016), por exemplo, descreveram alguns biomarcadores proteicos envolvidos em vias, utilizando redes de interações para o câncer de mama, tais como: ECM1 proteína de matriz extracelular, a família de enzimas quinases dependentes de ciclinas CDK, a serina síntese (PHGDH), glutamina (GLS), FBP2 e FBP1, são enzimas importantes na gliconeogênese, presentes principalmente no subtipo luminal A e B. Para o subtipo Triplo negativo (TN) os autores citaram: o complexo proteico MCM, DNA polimerases, proteínas de resposta a danos no DNA, como as CDK1, CDK2, CDK6 e PCNA.

Métodos proteômicos podem auxiliar na identificação de proteínas com alterações no perfil de expressão entre amostras biológicas distintas. Neste contexto, o presente estudo tem por objetivos avaliar diferenças estatisticamente significativas na expressão proteica de relevância para

discriminação proteômica dos subtipos triplo negativo e luminal B do câncer de mama, além de obter o proteoma de tecidos mamários do tumor primário de mama (T) de pacientes diagnosticados com diferentes subtipos moleculares de câncer de mama (Triplo Negativo e Luminal B). As proteínas diferencialmente expressas foram analisadas em seu contexto biológico para determinar potenciais marcadores que conferem características distintas a esses tumores.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O CÂNCER DE MAMA

Como referido na Introdução, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2020), a cada ano 9,6 milhões de pessoas morrem de câncer. Uma das principais causas para a alta mortalidade é que, mesmo em países com sistemas e serviços de saúde mais avançados, muitos casos de câncer são diagnosticados em estágio tardio, quando as chances de sucesso do tratamento são reduzidas.

O câncer é atualmente compreendido como uma doença multifatorial com alterações genéticas e epigenéticas (FEINBERG e TYCKO, 2004), que ocorre pelo acúmulo de mutações em genes que controlam o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular. As mutações se acumulam ao longo dos anos, até que a célula perde seus mecanismos de controle do crescimento e inicia-se um tumor (SUGIMURA, 1998).

Devido a sua alta incidência, o câncer de mama é alvo de políticas públicas no Brasil desde a década de 80. Diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença como: idade, fatores endócrinos e ou história reprodutiva, fatores comportamentais e ou ambientais e fatores genéticos. Sabe-se que a incidência e a mortalidade da doença aumentam em mulheres a partir dos 40 anos de idade sendo que abaixo de 40 anos ocorrem menos de 10 óbitos a cada 100 mil mulheres. Já a partir dos 50 anos de idade, o risco da doença é 10 vezes maior. Os fatores ambientais e comportamentais incluem, por exemplo: o alcoolismo, obesidade e/o sobrepeso e tabagismo. Já os genéticos estão relacionados a mutações hereditárias em determinados genes ou a herança multifatorial (INCA, 2020).

A redução de risco e o diagnóstico precoce da doença são os principais fatores para reduzir a mortalidade por câncer. Segundo o INCA 2020, é possível reduzir em 28% o risco de uma mulher desenvolver câncer de mama adquirindo alguns hábitos como praticar atividade física regularmente; alimentar-se de forma saudável; evitar uso de hormônios sintéticos em altas doses, entre outros. Já o diagnóstico precoce possibilita que as chances de cura sejam muito maiores para a paciente, chegando a 95%. Quanto mais avançado for o estágio do câncer de mama, quando a doença é detectada, ou

seja, quanto mais tarde a doença for diagnosticada e tratada, a chance de cura fica menor (INCA, 2020).

## 2.2 TUMORIGÊNESE

Os *hallmarks* do câncer, descritos por Hanahan e Weinberg (2011), representam as principais características biológicas adquiridas pelas células alteradas na formação de um tumor e progressão da doença e incluem a auto renovação ilimitada, proliferação autônoma, resistência a fatores antiproliferativos, à morte celular e aos mecanismos de defesa imune, alterações metabólicas adaptativas e a instabilidade genômica (FIGURA 1).

FIGURA 1: HALLMARKS DO CÂNCER



FONTE: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Segundo estes *hallmarks*, as características extrínsecas às células tumorais incluem a capacidade de indução de angiogênese, modificação do microambiente tecidual, evasão da resposta imune direcionada especificamente contra os tumores, modulação da resposta inflamatória e de reparo tecidual, resistência a apoptose e interação associada de células do microambiente nos processos de invasão e metástase. Estas habilidades podem conferir às células tumorais um potencial replicativo ilimitado, caracterizando a imortalização celular, apresentada pela maioria das linhagens

celulares em virtude da capacidade de proliferação em cultura sem evidenciar indícios de senescência ou crise celular (HANAHA E WEINBERG, 2011).

Os cânceres surgem de alterações genéticas sequenciais, que ocorrem como resultado da instabilidade genética e/ou de fatores ambientais (MUHAMMAD, 2003), e epigenéticas, a exemplo das modificações nos padrões de metilação que podem resultar no silenciamento de genes importantes, como os supressores de tumor (KLAJIC, 2018).

Em células tumorais, a ativação de produtos oncogênicos ou a perda de produtos de genes supressores de tumor, resultam em mudanças significativas no contexto de sinalização das redes de integração de sinal. Entre as mudanças, observa-se uma progressiva dominância das vias oncogênicas, sendo assim há uma progressiva dependência da célula tumoral às vias de sinalização (CHAMMAS, 2013). A figura 2 ilustra a progressão tumoral através de diferenciados níveis de alterações no tecido, culminando no desenvolvimento de tumores com capacidade invasiva e metastática, aspectos que caracterizam o câncer.

FIGURA 2 PROGRESSÃO CELULAR DO CÂNCER



FONTE: ADAPTADO DE WEINBERG (2007)

LEGENDA: Tumores podem se desenvolver por meio de uma série de crescimentos celulares descontrolados. Leve: uma pequena mudança no tecido. Moderada: presença de uma concentração maior de células alteradas. Severa: grande parte do tecido perdeu suas características originais. CIS: carcinoma *in situ*

Apesar dos avanços na detecção e tratamento de metástases do câncer de mama, a mortalidade permanece alta, em parte devido a limitação das terapias atuais pela presença de células tumorais resistentes à terapia.

## 2.3 HETEROGENEIDADE DO CÂNCER DE MAMA

Os cânceres evoluem por um processo de diversificação genética, e interações ambientais (HUANG et al., 2014). A subsequente progressão do tumor ocorre pelo acúmulo de alterações em genes reguladores do crescimento e diferenciação celular, que resulta na expansão clonal e seleção destas células (POLYAK, 2017). Uma estratégia terapêutica adequada para limitar o impacto da heterogeneidade tumoral, resultante do processo acima descrito, requer conhecimento molecular do tumor, estabelecendo assim uma lógica para terapia direcionada (HUANG et. al, 2014).

O *status* dos receptores hormonais tem sido tradicionalmente usado como fator prognóstico no câncer de mama. Os subtipos baseados em perfis moleculares são definidos por uma combinação de características morfológicas, genômicas e proteômicas.

Os subtipos fornecem um retrato molecular do tumor que auxilia no diagnóstico, no prognóstico e nas opções de seleção do tratamento. Assinaturas de expressão gênica descrevendo os subtipos intrínsecos, luminal A; luminal B; HER2, basal e normal-*like*, do câncer de mama para prever o risco de recorrência foram rapidamente adotadas na clínica. Apesar do uso de classificações em subtipos, muitos pacientes desenvolvem resistência a medicamentos e recidiva do câncer (MUELLER et al., 2018), o que justifica a importância da identificação de marcadores moleculares que evidenciem a heterogeneidade da doença.

### 2.3.1 Classificação Histológica

O sistema TNM é utilizado para descrever a extensão anatômica da doença, se o tumor primário é extenso, se há ausência ou presença de metástase em linfonodos ou em regiões distantes do tumor. A localização, em ducto ou lóbulo, deve ser descrita como uma primeira classificação. Esta avaliação é realizada juntamente com uma análise histológica (INCA, 2004).

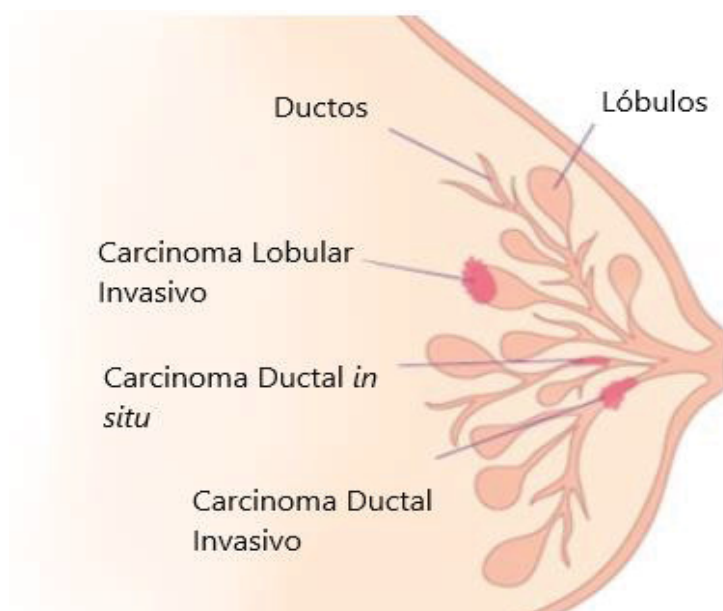
Na classificação histológica, parâmetros como tamanho do tumor, grau histológico, presença/ausência de linfonodos metastáticos, Receptores de estrógeno (RE) e Receptores de progesterona (RP), são usados na



classificação dos tumores mamários, sendo que o grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor, indicando maior ou menor capacidade de metástase. De acordo com Scarff e Torloni (1968), o grau de diferenciação histológica do tumor está baseado na análise de três parâmetros: a formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica.

O Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) é o tipo histológico mais comum de câncer de mama na população feminina, responsável por 80% dos carcinomas invasivos (GOBBI, 2012) enquanto o lobular invasivo é menos comum, representando cerca de 5-10% dos casos (Figura 3).

FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA MAMA SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA



Fonte: ADAPTADO DE MARCHIÒ e REIS-FILHO (2008)

LEGENDA: O carcinoma lobular invasivo é menos comum, representando cerca de 5-10% dos casos. Este tumor começa no lóbulo e se estende além do lóbulo no tecido normal. O carcinoma ductal invasivo é o mais comum apresentando características de invasão de tecido.

### 2.3.2 Classificação Molecular

Os estudos de expressão gênica realizados a partir dos anos 2000, através das técnicas de microarranjos, apresentaram novas perspectivas na clínica e na pesquisa do câncer de mama. Estas metodologias revelaram a

notável complexidade e heterogeneidade genética entre os tumores mamários (REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011).

Perou e colaboradores (2000) realizaram um dos estudos de expressão gênica que estabeleceu a base para a atual classificação molecular. De acordo com o perfil apresentado, os autores classificaram os tumores mamários em quatro subtipos moleculares: luminal, semelhante ao normal, HER2 e basal. Posteriormente, estudos realizados pelo mesmo grupo subdividiram o subtipo luminal em pelo menos outros dois subtipos (Luminal A e B) (SORLIE et al, 2001, 2003).

Entre estes, os tumores luminais apresentam expressão dos receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP) e são subdivididos em luminal A, caracterizados por crescimento lento e luminal B, com taxas de proliferação aumentadas (BAUER, 2007).

Estudos posteriores de perfil de expressão gênica baseados em assinatura de prognóstico possibilitaram, delimitar sete subtipos moleculares: luminal A, luminal B, tipo basal, HER2 enriquecido, semelhante ao normal, claudina baixa e molecular apócrino, cada qual apresentando *status* de RE, RP, HER2, citoqueratinas e marcadores do tipo basal distintos (tabela 1) (REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011). O subtipo claudina baixa é caracterizado, dentre outros aspectos, pela ausência ou baixa expressão de marcadores luminais, expressão elevada de marcadores relacionados ao processo de transição epitelial mesenquimal (TEM) e, geralmente, são tumores triplo negativos na imunoistoquímica, que não expressam RE, RP e HER2 (PRAT et al., 2010).

Estes sete subtipos moleculares podem ser caracterizados, principalmente, pela presença ou não de receptores de estrogênio (RE).

#### 2.3.2.1 Tumores Receptores de Estrógeno positivos

Neste grupo, encontra-se os tumores luminais e de perfil semelhante ao normal.

- Tumores luminais: Com perfil semelhante ao das células luminais do epitélio mamário normal, expressam citoqueratinas (CK) de baixo peso molecular, incluindo CK7, CK8, CK18 e CK19 e moléculas de adesão

celular epitelial (RAKHA, REIS-FILHO e ELLIS, 2008). Este subgrupo foi subdividido em luminal A e B por apresentarem expressão gênica distinta e comportamentos clínicos diferenciados; os primeiros apresentam alta expressão de RE e genes relacionados a este, enquanto os tumores luminais B apresentam alta expressão de genes relacionados ao ciclo celular e à proliferação, e podem super expressar a proteína HER2 (SORLIE et al., 2001, MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008).

- Tumores “semelhante ao normal”: O perfil de expressão gênica é similar ao do parênquima mamário normal e fibroadenomas. Estes tumores podem superexpressar genes de células basais e subexpressar genes luminais epiteliais. Os carcinomas lobulares, que se originam nos lóbulos da glândula mamária e são de menor incidência (5-10% dos casos) de característica invasora podem apresentar este perfil (MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008).

### 2.3.2.2 Tumores Receptores de Estrógeno negativos:

Este grupo inclui os tumores HER2 (em quantidades normais, esta proteína tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento de células) positivos e de fenótipo basal.

- Tumores HER2 positivos: São caracterizados pela alta expressão de genes relacionados à amplificação do gene *HER2* (MARCHIÒ e REIS-FILHO, 2008).
- Tumores de fenótipo basal: Apresentam células mioepiteliais que expressam CK5/6, CK14, CK17, vimentina, EGFR (receptor do fator de crescimento epidermico; do inglês: *epidermal growth factor receptor*) e possuem alta taxa proliferativa, mensurada, principalmente, pela expressão da proteína Ki-67, um marcador de proliferação celular. Este subgrupo normalmente apresenta perda das citoqueratinas, e, frequentemente, do receptor de progesterona (RP) e HER2 (RAKHA e ELLIS, 2009). Os tumores basais possuem o maior grau de heterogeneidade molecular dentre os demais subgrupos, apresentando também pior prognóstico clínico: frequentemente apresentam alto grau

de alterações histológicas e associações com mutações nos genes *BRCA1* e *TP53* (ROUZIER *et al.*, 2005).

Além dos subtipos supracitados, dois outros têm sido recentemente incluídos na classificação molecular: claudina baixa (do inglês: *claudin low*) e apócrino molecular (do inglês: *molecular apocrine*).

- Tumores claudina baixa: Estes tumores caracterizam-se pela baixa expressão das claudinas 3, 4 e 7 (proteínas de junção intracelular) e E-caderina (glicoproteína de adesão celular dependente de cálcio). Além disso, segundo Prat (2010), este subtipo tumoral apresenta perda de características comuns das células epiteliais e muitas características das chamadas células tronco iniciadoras de tumor. Comparado aos demais subgrupos, os tumores claudina baixa possuem baixa expressão de HER2 e de marcadores luminais (RE, RP, GATA3, CK18 e CK19), e cerca de 61 a 71% apresentam fenótipo triplo negativo (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007; PRAT *et al.*, 2010). Apesar da aparente similaridade com os tumores basais, este subtipo não expressa altos níveis de genes de proliferação e são tumores de ciclo proliferativo mais lento (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007; PRAT *et al.*, 2010).
- Tumores apócrino molecular: São tumores RE negativos, receptor de androgênio (RA) positivo e que compartilham algumas características com o grupo HER2. Possuem alta frequência de amplificação do gene *HER2* e características de glândulas apócrinas em exame histológico, porém apresentam-se como um grupo que possui sua própria assinatura gênica, daí o nome: apócrino molecular (MACGROGAN *et al.*, 2005).

A tabela 1 resume as principais características dos sete tipos de câncer de mama acima apresentados.

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA

	Marcadores Imunoistoquímicos	Grau Histológico	Índice Proliferativo	Outros marcadores	Prognóstico
<b>Luminal A</b>	RE+: 91–100% RP+: 70–74% HER2+: 8–11% Ki67: baixa expressão Marcadores basais:	GI/II: 70–87% GIII: 13–30%	Baixo	<i>FOXA1</i>	Bom

<b>Luminal B</b>	-				
	RE+: 91–100% RP+: 41–53% HER2+: 15–24% Ki67: alta expressão Marcadores basais: -	GI/II: 38–59% GIII: 41–62%	Alto	Amplificação de <i>FGFR1</i> e <i>ZIC3</i>	Ruim
<b>Basal</b>	RE+: 0–19% RP+: 6–13% HER2+: 9–13% Ki67: alta expressão Marcadores basais: +	GI/II: 7–12% GIII: 88–93%	Alto	RB1: baixa/–  CDKN2A: alta  BRCA1: baixa/– Amplificação do gene <i>FGFR2</i>	Ruim
<b>HER2</b>	RE+: 29–59% RP+: 25–30% HER2+: 66–71% Ki67: alta expressão Basal markers: –/+	GI/II: 11–45% GIII: 55–89%	Alto	GRB7: alta	Ruim
<b>Semelhante ao Normal</b>	RE+: 44–100% RP+: 22–63% HER2+: 0–13% Ki67: baixa/média Marcadores basais: –/+	GI/II: 37–80% GIII: 20–63%	Baixo/Médio		Intermediário
<b>Claudina Baixa</b>	RE+: 12–33% RP+: 22–23% HER2+: 6–22% Ki67: expressão média Marcadores Basais: +/-	GI/II: 62–23% GIII: 38–77%	Médio/alto	CDH1: baixa/– Claudinas: baixa/–	Intermediário
<b>Apócrino molecular</b>	RE– RP– HER2 +/- Ki67: alta expressão Marcadores basais: –/+	Predomina GII/GIII	Alto	Receptor de androgênio: +	Ruim

Legenda. Os termos: baixa, média e alta referem-se a expressão das proteínas.

Fonte: Modificado de REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011.

### 2.3.3 Classificação imunoistoquímica

Devido à dificuldade de classificar os subtipos na rotina clínica utilizando painéis de expressão genica, atualmente para a prática clínica utilizar-se a classificação imunoistoquímica em subtipos descritas por Goldhirsch et al.

(2013). Na classificação por imunoistoquímica o mais habitual é utilizar como marcadores: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), HER2 e Ki-67 (proteína utilizada como marcador de proliferação celular). A classificação utilizada é luminal A, luminal B, HER2 positivo e triplo negativo (GOLDHIRSCH et al., 2013).

#### 2.3.4 Os subtipos imunoistoquímicos do câncer de mama: Triplo Negativo x Luminal B

Os tumores mamários dos subtipos luminal e triplo negativo apresentam uma diferença na expressão de marcadores imunoistoquímicos, refletindo a heterogeneidade de seus perfis moleculares, os quais, por sua vez, podem fornecer informações sobre aspectos diagnósticos, prognósticos e terapêuticos.

##### 2.3.4.1 O subtipo Luminal B

A prevalência do subtipo luminal B varia de 10% a 30%. A histologia e a imunoistoquímica (IHC) de tumores luminal B apresentam características que incluem alto índice de Ki-67 (quando comparado ao luminal A), positividade para RE, RP e marcadores de epitélio luminal, como CK8 e CK18. Este subtipo possui uma menor taxa de mutação do gene *TP53* em comparação com os demais.

Tumores luminal B apresentam algumas semelhanças histológicas com subtipo luminal A, como a superexpressão de HER2, que resulta na classificação de tumores luminal B/HER2 negativos e B/HER2 positivos. O prognóstico para pacientes com tumores mamários luminal B é ligeiramente menos favorável do que o para as pacientes portadoras do luminal A (LAM, et. al. 2013).

##### 2.3.4.2 O subtipo Triplo Negativo

Tumores que não expressam RE, RP e HER2 são denominados “Triplo Negativos” (TN) e se caracterizam por um comportamento clínico agressivo, rápida progressão tumoral e baixa sobrevida (CLEATOR 2007, REIS-FILHO & TUTT, 2008), sendo responsáveis por 15% a 20% de todos os carcinomas mamários (BAUER et al., 2007). Estudos epidemiológicos mostram uma alta

prevalência de câncer de mama triplo negativo entre mulheres mais jovens e afrodescendentes (CAROTENUTO et. al. 2019). Embora sensível à quimioterapia, esses tumores possuem recidiva precoce comum e uma tendência por metástase visceral, incluindo cerebral (BURTET, 2014)

As abordagens de perfil de expressão gênica demonstraram que o câncer de mama TN é um grupo heterogêneo de doenças compostas de diferentes subtipos, molecularmente distintos (SCHORR; PEDRINI; REGINATTO, 2015). Embora não seja sinônimo, a maioria desses tumores apresenta o "tipo basal" como perfil molecular em matrizes de expressão gênica. No entanto, vários estudos demonstraram que o câncer de mama TN inclui tumores com um perfil de expressão não basal e, em particular, os subtipos "mama-normal", "marcador múltiplo negativo" e aqueles recentemente identificados como "negativo para claudina", sendo estes últimos detalhados no estudo de Carotenuto et al. (2019).

Os tratamentos direcionados as moléculas RE ou HER2 não são eficazes para tumores TN e, mesmo nos pacientes que apresentam alguma resposta à quimioterapia, houve uma alta recidiva (SCHORR; PEDRINI; REGINATTO, 2015). Assim, outros marcadores vêm sendo avaliados quanto a sua importância clínica, como por exemplo, a expressão de citoqueratinas basais, marcadores de proliferação (Ki-67, PCNA) e outros receptores, como EGFR e VEGFR (fator de crescimento endotelial vascular; do inglês: *vascular endothelial growth factor*) (VIEIRA et al., 2007). No entanto, estudos clínicos demonstraram que as terapias para o EGFR não são eficazes em pacientes TN e sua alta expressão também está correlacionada com mau prognóstico nesse subtipo molecular (NAKAI, 2018); Outras moléculas investigadas incluem os inibidores da polimerase de poli-ADP-ribose (PARP), é uma família de proteínas envolvidas em vários processos celulares, como reparo do DNA, estabilidade genômica e morte celular programada (CAROTENUTO et. al. 2019). O'Shaughnessy et al. (2011) apresentaram dados indicativos de que a utilização de PARP, em pacientes TN em ensaio clínico randomizado de fase III, melhora a sobrevida das pacientes. Assim, a terapêutica para este subtipo molecular de câncer de mama permanece com citotóxicos não direcionados.

Devido à dificuldade de sítios alvos para o tratamento do subtipo triplo negativo, é enfatizada a necessidade de identificar marcadores moleculares

envolvidos na patogênese para resposta terapêutica e sobrevida de pacientes com câncer de mama (CAMPOS et al., 2018). Dessa forma, percebe-se que um melhor conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese humana é de fundamental importância para a aplicação de procedimentos terapêuticos específicos. Neste contexto, as informações de estudos proteômicos se apresentam relevantes para a identificação de biomarcadores prognósticos e terapêuticos, possibilitando uma resposta eficaz (RESENDE, 2018). As análises de expressão proteica podem fornecer importantes biomarcadores de prognóstico inclusive nos tumores que apresentam boas respostas a terapia alvo (CARVALHO, 2019).

## 2.4 PROTEÔMICA

As ciências ômicas objetivam o entendimento do funcionamento celular e suas alterações biológicas. Fazem parte deste conjunto de ciências: a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica (Canuto et al, 2017).

Proteômica é um termo que se refere ao estudo de proteínas sob vários aspectos como: a identificação de proteínas, a ontologia proteica, interações proteína-proteína, envolvimento de proteínas em vias, quantificação proteica e análise funcional. Assim, a proteômica é uma estratégia atrativa para a identificação de biomarcadores (LAM et al., 2013).

Na análise de potenciais marcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico precoce e no tratamento de várias doenças humanas, incluindo o câncer, muitos estudos objetivam identificar alterações nos genes, seus transcritos e produtos proteicos envolvidos em processos celulares importantes. Informações sobre processos que modulam a função e a atividade proteica, como modificações pós traducionais, interações proteína-proteína, transporte e degradação proteicas, não são obtidas em análises de RNA (BARBOSA, 2012). Dessa forma, a análise proteômica, que permite acessar tais informações, fornece uma ampla gama de subáreas para a pesquisa por biomarcadores do câncer de mama

A proteômica pode demonstrar perspectivas e identificar biomarcadores proteicos que definem aspectos diferenciais na resistência terapêutica,



prognóstico e disseminação metastática em subtipos tumorais específicos (LAM et al., 2013).

Na abordagem proteômica, espectrômetros de massas têm sido cada vez mais utilizados como plataforma para estudos, auxiliando na análise de proteínas em amostras biológicas complexas e em diferentes condições de doença (LAM et al., 2013). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês: *High performance liquid chromatography*), aliada à *softwares* específicos, permite a análise quantitativa dos componentes das misturas em concentrações extremamente baixas (LANÇAS, 2009). Outra técnica de relevância na espectrometria de massas é a de ionização por eletrospray (ESI, do inglês: *Electrospray Ionization*), que permite a ionização do analito em solução aquosa quando este atravessa uma agulha capilar submetida à alta voltagem; a solução é ejetada como um aerossol de gotas altamente carregadas que, após evaporação do solvente por um fluxo de gás inerte aquecido, gera formas ionizadas do analito a ser analisado pelo espectrômetro de massas (BARBOSA, 2012).

As proteínas identificadas podem ser estudadas sob diversas perspectivas, sendo a análise de suas interações de relevância para a compreensão da funcionalidade dessas proteínas nos sistemas biológicos. Segundo Taylor (2009), alterações moleculares na rede de interatomoas, isto é, no conjunto de interações moleculares que ocorrem em uma determinada célula ou sistema biológico, podem ser preditoras significativas da evolução da doença, sugerindo que a quantificação dessas alterações auxilie nas condutas já utilizados na clínica.

Paralelamente às tecnologias utilizadas nos estudos envolvendo proteínas, se destacam os diversos bancos de dados que comportam volumes cada vez maiores de informações que, por sua vez, ampliam as possibilidades de estudo nas análises proteômicas e interatômicas. Entre esses bancos de dados, o STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*) tem como objetivo organizar e disponibilizar dados de interação proteína-proteína, incluindo associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) (SZKLARCZYK et al., 2015) e tem por diferencial agregar em um único local tanto dados experimentais quanto preditos, informar um escore de confiança associado a cada interação, permitir a transferência dos seus dados brutos bem como

apresentar recursos flexíveis de criação *online* de redes, com a possibilidade de recuperação dos dados associados às redes criadas.

As interações proteicas se mostram relevantes na tumorigênese mamária, uma vez que modificações pós traducionais, alteram a estrutura proteica e podem desempenhar funções importantes na localização, estabilidade, interações e funções de uma proteína (BERTUCCI et al., 2006).

Uma das principais complicações na proteômica é a análise biológica posterior aos dados proteômicos quantitativos gerados por proteínas altamente multivariadas, produzidos através da espectrometria de massas. A plataforma Perseus, por exemplo, apresenta diversos recursos estatísticos para análise de dados ômicos de alta resolução contemplando a normalização, reconhecimento de padrões, análise de séries temporais, comparações entre amostras e testes de hipóteses múltiplas (TYANOVA et al., 2016).

As consequências funcionais de perfis moleculares alterados referentes a cada subtipo do câncer de mama podem ser analisadas por métodos proteômicos através da identificação de diferenças quantitativas na expressão proteica, a exemplo dos estudos de Oliveira, 2011, Sousa, 2013 e Gomig, 2015 e 2019. As informações sobre interação proteína-proteína, estudo de redes podem informar sobre vias de sinalização que, analisadas no contexto da tumorigênese mamária, podem indicar alvos de interesse para a pesquisa no câncer de mama.

### 3 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é a primeira neoplasia mais comumente diagnosticada entre mulheres no mundo e sua incidência é maior nos países desenvolvidos. Na maioria dos casos, o fator de risco é multifatorial, com componentes genéticos e ambientais, combinados em um complexo de interações moleculares em células tumorais e/ou presentes no microambiente tumoral, resultando na progressão da doença. O diagnóstico de câncer de mama depende principalmente da tecnologia de exame imunohistopatológico, que tem como desvantagem a necessidade de análise de massa tumoral.

A Heterogeneidade do câncer de mama, confere ao mesmo características distintas para sua classificação, apresentando subtipos da doença com ação terapêutica distinta.

Entre os subtipos o Triplo Negativo, se caracteriza pela ausência de receptores de estrôgeno, progesterona e do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano. Essas características o tornam de difícil resposta terapêutica pela ausência de alvos para a ação de medicamentos. Outra característica do subtipo Triplo Negativo é sua capacidade de invasão em tecidos, lhe conferindo maior poder metastático. O conjunto destas propriedades caracteriza o câncer de mama Triplo Negativo como o mais agressivo dos subtipos.

O subtipo Luminal B apresenta receptores hormonais positivos. São caracterizados por expressarem genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular. Este subtipo apresenta um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A. A expressão de RE, RP, HER2 e do índice do Ki-67, distinguem o subtipo luminal A do luminal B onde o HER2 pode ser +/- no luminal B e o índice do Ki-67 é mais elevado quando comparado ao luminal A (FENG et al. 2018). O subtipo luminal B foi significativamente associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença quando comparado ao luminal A (FENG et al. 2018).

Análises proteômicas em tecidos cancerosos humanos representam uma importante possibilidade de identificar biomarcadores relevantes para ações terapêuticas e prognósticas da doença. As informações sobre a diferença de expressão, interação proteína-proteína, redes de interações

proteicas podem indicar vias de sinalização de relevância na tumorigênese mamária.

Assim, para ampliar a compreensão do perfil proteômico diferencial entre subtipos do câncer mama, a análise comparativa de subtipos com relevantes diferenças clínicas e imunohistoquímicas, como o Triplo Negativo e Luminal B, pode fornecer importantes informações sobre a biologia molecular destes tumores, potencialmente com importância terapêutica e na identificação de biomarcadores.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Analisar proteínas que apresentem diferença de expressão significativa entre os tecidos mamários de tumor primário correspondentes em pacientes portadoras de carcinoma mamário dos subtipos Triplo Negativo e Luminal B, no contexto de suas funções biológicas, para identificar potenciais biomarcadores que conferem características distintas a esses tumores.

### 4.2 Objetivos específicos

- Identificar as proteínas diferencialmente expressas entre os tumores de subtipos moleculares selecionados;
- Analisar essas proteínas no contexto de suas funções biológicas;
- Validar a expressão das proteínas diferencialmente expressas definidas como de interesse para o estudo no câncer de mama.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 AMOSTRAS

Este estudo pertence a um amplo projeto de pesquisa na área de genética dos tumores mamários, que vem sendo desenvolvido pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO), do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, e pelo Serviço de Mastologia do Hospital Nossa Senhora das Graças (Curitiba, PR). O projeto foi aprovado por Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da UFPR: CAAE n. 19870319.3.0000.0102.

As amostras de tecidos mamários não tumorais, do tumor primário de mama e do linfonodo axilar metastático utilizadas no presente estudo foram previamente processadas e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) no projeto que implementou o método de proteômica de alta *performance* no LabCHO, resultando na obtenção dos dados de identificação e quantificação das proteínas em cada amostra.

Os dados analisados no presente estudo são provenientes de pacientes atendidas no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba PR, cujas informações clínico-patológicas são apresentadas na tabela 2.

TABELA 2 DESCRIÇÃO DAS INFORMAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DAS PACIENTES

Amostra	Idade	Diagnóstico	Subtipo	Grau do tumor	Metástase em L	Tecidos
<b>P1</b>	63	CDI	Lum. B	II	P	T / Na / Nct
<b>P2</b>	39	CDI	TN	II	A	T / Na / Nct
<b>P3</b>	67	CDI	TN	III	P	T / Na / Nct / L
<b>P4</b>	59	CDI	Lum. B	III	P	T / Na / Nct / L

LEGENDA: Tumoral (T), Não tumoral Adjacente ao tumor (Na), Não tumoral contralateral (Nct), Linfonodo axilar (L), Carcinoma ductal invasivo (CDI)

### 5.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A extração das proteínas foi previamente realizada com tampão de lise composto por 4% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 7,6 e 0,1 M DTT, com homogeneização através do equipamento *TissueLyser II* (Qiagen), e aquecimento das amostras a 95°C durante 3 minutos, sendo as etapas de homogeneização e de aquecimento realizadas três vezes. Posteriormente, o

extrato foi sonificado por uma hora em banho de gelo. A quantificação das proteínas foi obtida através do método de Bradford a leitura foi realizada no *Qubit 2.0 Fluorometer* (Life Technologies).

Na etapa de preparo para a espectrometria de massa, a amostra foi submetida à separação de proteínas por eletroforese unidimensional (1-D). As proteínas foram digeridas no gel em solução de tripsina a 37°C por aproximadamente 16 horas. As amostras de cada tecido foram desagregadas por nano cromatografia líquida de fase reversa utilizando o cromatógrafo EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific), acoplado ao LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific), para realizar a análise por MS por ionização ESI (ESI-MS/MS).

Os dados da MS foram processados no programa MaxQuant versão 1.5.8.3 (TYANOVA et al., 2016) para a identificação das proteínas. A partir desta etapa foram realizadas as análises que compõem este estudo.

### 5.3 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS

Todas as análises para a identificação das proteínas diferencialmente expressas foram realizadas no programa Perseus (TYANOVA et al., 2016), no qual foram efetuados o processamento e as análises estatísticas dos dados. A lista de proteínas identificadas e quantificadas na espectrometria de massas foi processada para a retirada de contaminantes, os grupos para a análise comparativa foram estipulados, todos os dados passaram para logaritmo de base 2 ( $\log_2$ ).

Os dados utilizados para o teste estatístico compreenderam proteínas quantificadas em pelo menos 70% das amostras para cada tecido. A normalização dos valores de quantificação proteica foi realizada pelo método *width adjustment* e os valores inválidos foram substituídos por valores que representam a quantificação das proteínas de menor abundância, conforme a distribuição normal. Os testes estatísticos não paramétricos foram realizados no programa Perseus, sendo eles Teste-*t* Student e análise de variância (ANOVA).

Como resultado, foram obtidas tabelas comparativas indicando as proteínas que apresentaram diferença de expressão significativa ( $p < 0,05$ ) e a

diferença de expressão entre os tecidos foi avaliada através do *fold change* (FC), mantendo-se os dados em logaritmo de base 2 ( $\log_2$  FC).

Para a identificação de proteínas diferencialmente expressas ( $p < 0,05$ ), foram realizadas comparações entre os tecidos tumoral (T), considerando separadamente os subtipos triplo negativo (TN) e luminal B (LumB) – caracterizando uma análise entre os tecidos T de ambos os subtipos (TN x LumB) – análise inter-subtipos ( $T_{TN} \times T_{LB}$ ).

Uma segunda abordagem consistiu na obtenção de proteínas com diferença de expressão igual ou superior a 1,5 vezes, considerando-se proteínas como superexpressas ( $FC \leq 1,5$ ) e subexpressas ( $FC \geq 1,5$ ) em um tecido em relação ao outro.

#### 5.4 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS E PREDIÇÃO DE INTERAÇÕES PROTEICAS

A análise *in silico* das proteínas diferencialmente expressas com FC de 1,5 foi realizada nos bancos de dados público como: Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) v. 4.0.0 e Ingenuity Pathway Analysis (IPA) v. 2.3, para análise de redes de interação proteica, Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) v. 11.0, e o The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v.6.8. para anotações funcionais das proteínas provenientes da espectrometria.

STRING é um banco de dados de interações proteína-proteína conhecidas e previstas. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais); decorrem de predição computacional, de transferência de conhecimento entre organismos e de interações agregadas de outros bancos de dados (primários) (SZKLARCZYK, 2015).

O IPA é um aplicativo de software completo, baseado na Web, que permite a análise, integração e entendimento de dados de expressão gênica, microarranjos de miRNA e SNP, além de experimentos de metabolômica, proteômica e RNAseq (QIAGEN Inc., <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuitypathway-analysis>).

A plataforma GSEA é baseada no banco de dados de assinaturas moleculares MSigDB v. 6.2 (LIBERZON, 2015), que representa uma ampla



gama de processos biológicos e doenças, e seu método para realizar anotação funcional de genes em funções, processos e vias biológicas bem como em hallmarks (representam estados ou processos biológicos bem estabelecidos), entre outros, auxilia na interpretação de dados de expressão gênica (e de proteômica) comparando grupos de genes que compartilham funções biológicas comuns (SUBRAMANIAN, 2005). Essa análise foi aplicada aos genes que codificam as proteínas diferencialmente expressas obtidas neste estudo.

As funções biológicas e possíveis interações entre as proteínas diferencialmente expressas foram investigadas através de análises de anotação funcional utilizando os bancos de dados, baseando-se nos termos do Gene Ontology v. 2.0, o programa FunRich v. 3.1.3 e DAVID v.6.8. foram utilizados para análises de enriquecimento funcional (ASHBURNER, 2000).

## 5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE E DAS INTERAÇÕES PROTEICAS

A anotação funcional das proteínas diferencialmente expressas e a predição de suas interações permitiu a seleção de alvos de interesse para o estudo no câncer de mama. Proteínas que apresentaram relevância funcional na tumorigênese e que constituam potenciais marcadores para a discriminação entre os subtipos luminal e triplo negativo foram avaliadas na literatura e em bancos de dados de interação proteica para definir proteínas candidatas à validação de expressão nos tecidos estudados e à investigação de suas interações com outras proteínas.

A avaliação da expressão proteica foi realizada através do método *Western Blotting*, o qual consiste na detecção de proteínas específicas em amostras de lisados ou tecidos celulares, cujo procedimento encontra-se descrito por Mahmood (2012). O protocolo utilizado no presente estudo foi adaptado de Southern (1975), Burnette (1981) e Mahmood (2012), Vieira (2013).

### 5.5.1 Preparo e corrida dos géis unidimensionais

Esta técnica foi utilizada para a separação eletroforética das proteínas totais em géis de 1,5 mm. Para o gel de corrida (lower gel) a 10% utilizou-se H<sub>2</sub>O destilada 3,3 ml, solução a 30% de bis acrilamida em tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8 contendo 0,4% de SDS 4,0 ml, Lower Buffer 2,6 ml, agente catalizador 10% APS (Persulfato de Amônio) 100 µl e TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina) adicionados logo antes da aplicação 8µl. Para o gel de empilhamento (Upper Gel), foi utilizado H<sub>2</sub>O 2,1 ml, uma concentração de 30% de bis acrilamida em tampão Tris-HCl 1 M (pH 6,8) contendo 0,4% de SDS 500µl. Upper Buffer 410 µl. Agentes catalizadores foram utilizados para promover a polimerização dos géis, 10% APS (Persulfato de Amônio) 30µl e TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina) 6 µl, adicionados logo antes da aplicação. Esses géis foram utilizados para as proteínas CNNTB1 apresenta peso molecular de 90 kDa e CUL3 um peso molecular estimado entre 90 kDa – 65 kDa. Para a validação da FN1 um gel com maior porosidade foi necessário devido ao seu tamanho molecular de 250 kDa, para o gel de corrida (Lower Gel) 8% utilizou-se H<sub>2</sub>O destilada 4,6 ml solução a 30% de bis-acrilamida em tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8 contendo 0,4% de SDS 2,6 ml, Lower Buffer 2,6 ml, agente catalizador 10% APS (Persulfato de Amônio) 100 µl e TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina) adicionados logo antes da aplicação 10µl. Para o gel de empilhamento (Upper Gel), foi utilizado H<sub>2</sub>O 3 ml, uma concentração de 30% de bis acrilamida em tampão Tris-HCl 1 M (pH 6,8) contendo 0,4% de SDS 670µl. Upper Buffer 126 µl. Agentes catalizadores foram utilizados para promover a polimerização dos géis, 10% APS (Persulfato de Amônio) 50µl e TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina) 5 µl, adicionados logo antes da aplicação.

#### 5.5.1.1 Amostras de Tecido

A concentração de proteína aplicada no gel foi de 45 µg/µl totais, sendo utilizados os seguintes volumes: tampão de lise – 17 µl, amostra de proteína total – 55 µl e tampão de corrida 5x – 18 µl. A corrida foi realizada em 15 a 40 mA/gel até a entrada das proteínas no gel de separação, com posterior aumento para 50 mA/gel até que a frente de migração atingisse o limite inferior do gel; a voltagem variou de 100 V a 150 V, aumentado a voltagem

gradativamente 10V a cada 15 minutos. O total de tempo de corrida foi em torno de 1:30 horas. A determinação da massa das proteínas de interesse foi efetuada com o uso de marcador de massa molecular, amplitude de 10kDa a 170kDa (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder). Para cada amostra foram confeccionados géis em duplicata.

#### 5.5.1.2 Amostras de Linhagens

Para a validação da expressão das proteínas, duas linhagens representativas de cada subtipo (Luminal B e Triplo Negativo) foram cultivadas e utilizadas para a extração das proteínas.

Foram utilizadas as linhagens BT474 (Luminal B) e MDA MB 231 (Triplo Negativa), que foram cultivadas em Meio Dulbecco MEM (DMEM) com HEPES, 5% FBS e 1% L-Glutamina (Aminoácidos não essenciais) + insulina a 5% CO<sub>2</sub> e com meio RPMI-1640 com 5% FBS, 1% p/s e 1% Glutamina + insulina, a 5% CO<sub>2</sub>, respectivamente.

Após atingir a confluência esperada, as células foram removidas do frasco com auxílio de tripsina 0,05% e EDTA em PBS 0,04%, centrifugadas por 4 minutos a 1500 rpm e, após tratados, os *pellets* foram armazenados a -80°C.

Para extração e solubilização das proteínas, os pellets celulares obtidos (1x10<sup>6</sup> células) foram descongelados, centrifugados a 72 g em 4°C por 5 minutos e os resquícios de meio de cultura/armazenamento foram eliminados. Após, foram acrescidos 100 µL de tampão de lise (20 mM Tris 137 mM NaCl, 1% triton, 2 mM EDTA, HCl pH 8.0 e Inibidor de protease Roche) e uma rápida homogeneização foi realizada com a ponteira até o pellet de células se desfazer, seguindo-se por um período de incubação de 5 minutos no gelo.

Em seguida, cada amostra foi centrifugada em 10.000 x g a 4°C por 20 minutos, para separação das proteínas do restante do conteúdo celular. Após a centrifugação, o sobrenadante com o conteúdo proteico das células, o qual foi separado e quantificado através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Ao final do processo, foram obtidos os extratos proteicos das duas linhagens utilizadas no estudo para a validação via *Western Blotting*.

#### 5.5.2 Western Blotting

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (GE Piscataway, NJ) no aparelho Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) com tampão de transferência (192 mM glicina, 25 mM Tris, 0,037% SDS e 20% metanol) por 2 horas a 100 V. A eficiência da transferência foi verificada após coloração da membrana com vermelho de Ponceau (0,2% corante e 3% ácido acético glacial). As membranas foram lavadas 2x com TBS-T (120 mMNaCl, 20 mM Tris e 0,05% Tween 20) para a remoção do corante. Na incubação com TBS-T/leite (45 ml de TBS-T contendo 5g de leite liofilizado, desnatado e desengordurado – Molico, Nestlé), a membrana foi coberta por uma hora para bloqueio dos sítios livres. Após a incubação com o anticorpo primário (MyBioSource), as membranas foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 4° C em 4 ml de solução contendo o anticorpo primário anti-CTNNB1 (MyBioSource) e TBS-T/leite na proporção de 1:1000; anticorpo primário anti-CUL3 (MyBioSource) e TBS-T/leite na proporção de 1:2000; e anticorpo primário anti-FN1 (MyBioSource) e TBS-T/leite na proporção de 1:1000, realizando a diluição separadamente para cada anticorpo primário.

Após a incubação, foram realizadas três lavagens de 5 minutos cada em TBS-T para posterior cobertura das membranas em 4 ml de solução de anticorpo secundário anti-coelho HRP (GE Healthcare) e TBS-T/leite na proporção de 1:3000 por uma hora a temperatura ambiente. Para a reação de *Western Blotting*, as membranas foram lavadas por mais três vezes de 5 minutos em TBS-T, alocadas sobre uma folha plástica em cassete fotográfico e cobertas com 1 ml de substrato quimioluminescente (ThermoFisher) por cerca de 5 minutos para ser, então, coberta por outra folha plástica. O excesso do substrato foi removido e, para a revelação foi utilizado o fotodocumentador Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare). A membrana foi exposta para leitura e obtenção de imagem até a obtenção do sinal e posteriormente as imagens digitais foram armazenadas para posterior análise.

A apresentação das imagens reveladas no *Western Blotting*, foram realizadas no programa ImageJ v. 1.5.2 e InkScape V.0.92.3, realizando a comparação entre os tecidos de Triplo Negativo e Luminal B. A intensidade das bandas foi quantificada usando o software ImageJ. Para a produção dos

gráficos com os dados do ImageJ, foi utilizado o programa graphPad Prism v.7.0.

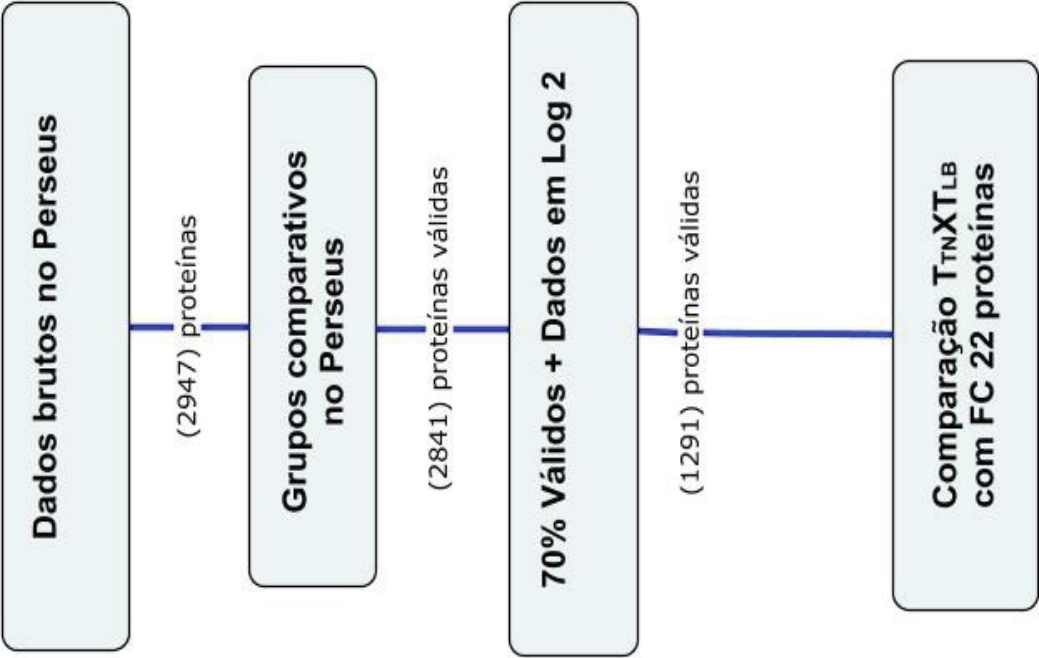
## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Análises proteômicas têm identificado proteínas envolvidas nos processos dinâmicos que ocorrem após alterações do estado fisiológico celular através de comparações das concentrações proteicas prévias e posteriores a essas alterações (SANTOS, 2004). De acordo com Szabo et al. (2012), a proteômica tem sido amplamente utilizada na identificação de importantes proteínas e na mensuração dos níveis de expressão proteica associada aos processos biológicos e patológicos, sendo aplicável no estudo de doenças humanas e na clínica, proporcionando a busca por marcadores que possam auxiliar na detecção precoce e no diagnóstico do câncer e da doença metastática (SAVINO et al., 2012). Assim, ressalta-se a importância e a necessidade de avanços no conhecimento em biologia molecular para fins de auxílio de diagnóstico e terapias utilizando biomarcadores moleculares.

### **6.1 IDENTIFICAÇÃO DO PROTEOMA DIFERENCIAL ENTRE OS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B**

A análise das proteínas diferencialmente expressas foi realizada no programa Perseus v.1.6.2.2, a partir da identificação e quantificação das proteínas expressas nos tecidos de tumores mamários TN e LB. As etapas desta análise são descritas na figura 4.

FIGURA 4: FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE ANÁLISE DE DADOS NO PROGRAMA PERSEUS V 1.6.2.2.



Fonte: O Autor 2020

Legendas: FC- *Fold Change*, T<sub>TN</sub>- Tumor de Tripla Negativo e T<sub>LB</sub>- Tumor de Luminal B.

Nota: Passo a passo para a realização das análises no programa Perseus 1.6.2.2. Amostras de dados brutos provenientes da espectrometria de massa, retirado contaminantes em 3 etapas, formação dos grupos para realizar as comparações entre tecidos de um mesmo subtipo e a comparação entre os tumores de subtipos diferentes. Normalização dos dados para Log2, realizado os testes estatísticos como Teste t de STUDENT. Comparação entre os tecidos com *Fold Change* de 1,5

TABELA 3. COMPARAÇÃO ENTRE OS TECIDOS DE TUMORES MAMÁRIOS TRIPLA NEGATIVO E LUMINAL B.

Código UniprotKB	Nome da proteína	Sigla do gene	Expressão no T <sub>TN</sub>	Expressão no T <sub>LB</sub>	Fold Change $\pm$ log2 0,58 T <sub>TN</sub> x T <sub>LB</sub>	p-valor
A0A087WXS7	ATPase ASNA1	ASNA1	-0.8907	-0.2328	-0.6579 ↓	0.0192
A0A0A0MTS2	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	1.6810	1.01528	0.6657 ↑	0.0045
A0A0A6YYL4	Coronin; Coronin-7	CORO7- PAM16; CORO7	-1.8159	-1.1796	-0.6363 ↓	0.0176
A0A0G2JMH6	HLA class II histocompatibility antigen	HLAII	-0.1264	0.4717	-0.5981 ↓	0.0291
A0A0G2JNZ2	Protein scribble homolog	SCRIB	-0.8636	-1.52734	0.6638 ↑	0.0134
A0A286YF22	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	1.4529	0.3706	1.0823 ↑	0.0393
B4DGU4	Catenin beta-1	CTNNB1	0.3635	-0.3333	0.6969 ↑	0.0365
E7EVA0	Microtubule-associated protein; Microtubule-associated protein 4	MAP4	0.0829	0.7319	-0.6490 ↓	0.0015
P02751	Fibronectin; Anastellin; Ugl-Y1; Ugl-Y2; Ugl-Y3	FN1	1.6738	2.3187	-0.6449 ↓	0.0393
P09488	Glutathione S-transferase Mu 1; Glutathione S-transferase Mu 4	GSTM1; GSTM4	-1.5815	0.2598	-1.8413 ↓	0.0447
P11166	Solute carrier family 2 facilitated glucose transporter member 1	SLC2A1	-1.1730	-2.0338	0.8608 ↑	0.0479
P23297	Protein S100-A1; Protein S100	S100A1	-0.5189	-2.2324	1.7135 ↑	0.0270
P24844	Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9	-1.8103	-0.1194	-1.6909 ↓	0.0180
P40261	Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	-1.3281	-0.0641	-1.2640 ↓	0.0086
P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT	0.7905	0.0559	0.7346 ↑	0.0428
P48163	NADP-dependent malic enzyme	ME1	-1.5651	-0.9807	-0.5844 ↓	0.0293
P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	ARHGDIB	0.3611	1.0869	-0.7258 ↓	0.0342
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F; Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F N-terminally processed	HNRNPF	-0.7489	0.0828	-0.8317 ↓	0.0277
P53004	Biliverdin reductase A	BLVRA	-0.1928	0.4979	-0.6908 ↓	0.0021
Q13618	Cullin-3	CUL3	-0.9448	-1.5649	0.6201 ↑	0.0376
Q14344	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	GNA13	-1.2276	-0.4249	-0.8027 ↓	0.0432
Q9UHY7	Enolase-phosphatase E1	ENOPH1	-1.6007	-0.8570	-0.7437 ↓	0.0432

LEGENDA: FC- Fold Change, T<sub>TN</sub>- Tumor de Tripto Negativo, T<sub>LB</sub>- Tumor de Luminal B. NOTA: A tabela apresenta FC  $\pm$  log2 de 0,58, correspondendo à expressão aumentada (seta para cima) ou diminuída (seta para baixo) das proteínas em tumores triplo negativo em relação ao subtipo luminal B. FONTE: O Autor (2020)



Vinte e duas proteínas foram observadas com diferença significativa de expressão entre tumores TN e LB, sendo GSTM1/GSTM4, MYL9 e NNMT as que apresentaram os maiores valores de FC, todas com expressão diminuída no subtipo TN em relação ao LB. Em contrapartida, oito proteínas foram superexpressas em T<sub>TN</sub> quando comparadas com T<sub>LB</sub>, com os maiores FC identificados para S100A1 e PHGDH.

Em relação às proteínas glutathionas S-transferases (família GSTM), oito classes foram identificadas em mamíferos: *alfa*, *kappa*, *mu*, *ómega*, *pi*, *sigma*, *teta* e *zeta* (INGENUITY TARGET EXPLORER, 2019). *GSTM1* codifica uma glutathiona S-transferase que pertence à classe *mu*, que atua na desintoxicação de compostos eletrofílicos, incluindo agentes cancerígenos, medicamentos terapêuticos, toxinas ambientais e produtos do estresse oxidativo, por conjugação com glutathiona. Os genes que codificam a classe *mu* de enzimas estão organizados em um agrupamento no cromossomo 1p13.3 e são altamente polimórficos (INGENUITY TARGET EXPLORER, 2019).

Estudos analisando o envolvimento de GSTM1, GSTT1 e polimorfismos GSTP1 na suscetibilidade à toxicidade de agentes quimioterápicos indicaram que indivíduos portadores de genótipos variantes de GST são menos capazes de desintoxicar os metabólitos de medicamentos e agentes cancerígenos alvos para terapia usados no tratamento de câncer colorretal, câncer de bexiga, osteossarcoma, câncer de mama e outros (ZHANG et al., 2012; DJUKIC et al., 2013; DUGGAN et al., 2013; VREULS et al., 2013; KAP et al., 2014). No caso de GSTM3, Lin (2018) avaliou os níveis de expressão gênica, observando níveis mais altos de mRNA em pacientes com câncer de mama RE positivo quando comparado ao tecido não tumoral, o que, segundo o autor, confere uma resistência ao tratamento com Tamoxifeno. Isso se deve a atuação da família das glutathionas S-transferases na desintoxicação de compostos eletrofílicos. Lee (2019) refere-se a Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1), como um dos 16 principais genes para o ensaio oncotypeDX® (OncotypeDX®; Genômica Health Inc., Redwood City, CA, USA), este painel genômico para câncer de mama foi desenvolvido para discriminar pacientes de alto risco com tumores negativos para receptores de estrogênio (RE) dos pacientes com tumores positivos para tal receptor.



Louse et al. (2016) e Chen et al. (2017), descreveram Glutathione S-transferase Pi 1 (GSTP1) como um direcionador metabólico crítico que é aumentado especificamente em câncer de mama triplo negativo e impulsiona a patogenicidade do câncer de mama, GSTP1 é uma proteína da família da GSTM3. Dada a importância dessas proteínas no câncer, o presente estudo indica a expressão diferencial de proteínas GSTM no câncer de mama, a qual pode ter função no contexto da tumorigênese de cada subtipo tumoral.

A cadeia leve da miosina 9 (MYL9) é necessária para a dinâmica do citoesqueleto e a metástase. MYL9 refere-se a um polipeptídeo leve regulador da miosina 9, que pode desempenhar funções importantes em vários cânceres humanos, sendo sua expressão e fosforilação descrita como aumentada no câncer de mama (PENG et al., 2016). Segundo Luo et al. (2014), a superexpressão da histona metiltransferase SMYD3 (envolvida na proliferação de células tumorais) promove a regulação positiva do MYL9, aumentando a característica migratória em células da linhagem de câncer de mama MCF-7. No carcinoma espinocelular de células esofágicas, o estudo de Wang et al. (2017), apresentou a expressão de MYL9 como potencial marcador prognóstico e terapêutico e discutiu os níveis contrastantes de expressão da proteína em diferentes estudos no câncer, sendo sua baixa expressão observada em pacientes com câncer de pulmão, bexiga, cólon e próstata. Medjkane et al. (2009) descreveram o impacto negativo da depleção de MYL9 sobre a capacidade invasiva de células cancerosas da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (TN), sem, no entanto, afetar a progressão do ciclo celular ou induzir à apoptose.

A nicotinamida N- metiltransferase (NNMT) que é predominantemente expresso no fígado, catalisa a N-metilação da nicotinamida, piridinas e outras substâncias estruturais análogos que estão envolvidos na biotransformação e desintoxicação de muitos medicamentos e compostos xenobióticos. Estas enzimas têm uma função central na regulação do equilíbrio da nicotinamida atuando na produção de energia, longevidade e resistência celular a estresse ou lesão (WILLIAMS et al., 2005). Wang et al., (2019) descreveu que um alto nível de expressão de NNMT está associado a uma baixa sobrevida e baixa resposta a quimioterapia em pacientes com câncer de mama.

Sedaghat et al., (2008) descreveram a superexpressão de S100A1 no câncer de mama, corroborando com demais estudos que evidenciam a expressão alterada de muitos membros da família de S100 em vários tipos de câncer, incluindo os de mama, pulmão, rim, bexiga, gástrico, tireoide, próstata e oral.

Chen et al., (2015) demonstraram que mediadores a jusante de *S100A6* responsáveis pela promoção da migração e invasão de células de câncer pancreático, aumentaram significativamente nos níveis de mRNA de  $\beta$ -catenina nas células de câncer pancreático.

Chen et al., (2014) caracterizaram as proteínas da família S100 pela sua interação com diferentes alvos proteicos, sofrendo uma mudança conformacional na ligação de cálcio, exercendo assim uma ampla gama de funções intracelulares e extracelulares, como proliferação celular, metástase, angiogênese e evasão imunológica

Tian et al., (2017) demonstraram resultados de superexpressão de S100A1 promovendo significativamente a proliferação em linhagem de células de câncer de ovários. Corroborando com as descrições de função e expressão, em nosso estudo, a expressão de S100A1 foi aumentada no tecido tumoral TN em cerca de 1,7 vezes.

A função da proteína PHGDH é catalisar o primeiro passo na via da biossíntese de serina e as células de câncer de mama com alta expressão de PHGDH têm elevações na síntese de serina (LOCASALE, 2011).

Gromova et al. (2015) descreveram expressão diferencial de PHGDH entre células mioepiteliais e epiteliais do tecido mamário, o que facilita o diagnóstico imunoistoquímico.

O estudo de Possemato (2011) demonstrou a proteína PHGDH elevada em 70% dos cânceres de mama RE negativos, com altos níveis de mRNA de PHGDH, e associados à baixa sobrevida em 5 anos em TN, além de PHGDH está elevado no Tumor TN em relação ao tecido mamário normal e por fim o PHGDH tem a expressão mais significativamente elevada no câncer de mama Triplo Negativo.

Nesse estudo a PHGDH apresentou uma superexpressão de 1,1 do FC de log2 no tumor TN quando comparado ao tumor LB.

Além das proteínas descritas acima, CTNNB1, FN1 e CUL3 foram diferencialmente expressas entre tumores TN e LB, sendo que CTNNB1 também apresentou diferença de expressão significativa na comparação  $T_{TN}$  x  $N_{aTN}$ , com superexpressão no tecido tumoral (APÊNDICE 2).

Essas proteínas apresentam relevância na tumorigênese mamária por ambas estarem envolvidas com vias relacionadas a migração e metástase. CTNNB1 proteína bem descrita no câncer de mama, envolvida na via canônica de Wnt/  $\beta$ - catenina, sua variação de expressão é atribuída à sinalização Wnt canônica e oncogênica, ativada no Triplo Negativo (LIN, 2000), nesse estudo a CTNNB1 apresentou expressão de 0,70 no FC de log2 na relação TNxLB. FN1 está envolvida no processo de Transição Epitélio Mesenquimal (TEM), tem sido frequentemente utilizada como um dos marcadores mesenquimais (CRAENE, 2013), a expressão foi -0,64 no FC de log2 em tumor TN quando comparado ao tumor LB. E CUL3, por sua vez, foi descrita por Hou (2015) sua superexpressão em câncer de mama foi significativamente correlacionada com metástases à distância, CUL3 apresentou expressão de 0,62 no FC de log2 no TN no nesse estudo .

As proteínas CTNNB1, FN1 e CUL3 atuam em vias semelhantes como, invasão, migração e metástases, cada uma em sua via conectando a ação final que caracteriza a agressividade do câncer Triplo Negativo, por esses motivos essas proteínas foram selecionadas para a validação.

## 6.2 ANOTAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS ENTRE OS TUMORES TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B

As proteínas diferencialmente expressas entre os tumores mamários TN e LB foram analisados no programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA) v. 2.3, que nos permite identificar redes biológicas e potenciais genes reguladores para a obtenção de informações referentes ao contexto biológico de atuação dessas proteínas na célula bem como nos processos envolvidos na tumorigênese mamária. Esses dados foram gerados utilizando as 22 proteínas e sua relação com vias do câncer, funções celulares e/ou enriquecimento dessas funções, reguladores *upstream* e biomarcadores já validados inclusos nos bancos de dados do IPA e *FunRich*. Contudo, em concordância com a seleção de proteínas a serem validadas no presente estudo, apenas os dados

do IPA e *FunRich* relativos às proteínas CTNNB1, FN1 e CUL 3 serão descritos abaixo.

Entre as vias canônicas identificadas para o conjunto de proteínas analisado, se destacam a sinalização mediada por ILK, proteína quinase A, p53, PI3K/AKT e Wnt/ $\beta$ -catenina, que foram relacionadas principalmente à CTNNB1; a via de sinalização de xenobióticos, relacionada à CTNNB1 e CUL3; vias relacionadas à motilidade celular, como a sinalização de citoesqueleto de actina relacionada a FN1, junções GAP, via de regulação da transmissão epitélio mesenquimal às quais CTNNB1 foi relacionada. Além disso, CTNNB1 foi identificada em vias de sinalização de outros tipos de câncer, como tireoide, endométrio, próstata, ovário, glioblastoma e câncer colorretal. A proteína CUL3, por sua vez, foi relacionada à resposta de estresse oxidativo mediada por NRF2 (APÊNDICE 1) (INGENUITY TARGET EXPLORER, 2019).

#### 6.2.1 Vias biológicas e sua relação com as proteínas diferencialmente expressas

Análises de enriquecimento geradas com predições do GO via *FunRich* estão descritas na tabela 4, sendo em geral compatível com as informações geradas no IPA, o que evidencia a função das proteínas CTNNB1, FN1 e CUL3 em processos relacionados à motilidade celular, como a sinalização envolvendo  $\beta$ -catenina, RAC e Rho GTPases e a adesão celular.

TABELA 4. VIAS BIOLÓGICAS RELACIONADAS COM AS PROTEÍNAS SELECIONADAS PARA VALIDAÇÃO

Via biológica	Fold de enriquecimento	P-value (Teste hipergeométrico)	Genes mapeados (do conjunto de dados de entrada)
Cascata de fosforilação da beta-catenina	50.3200	0.0198	CTNNB1
Clivagem apoptótica de proteínas de adesão celular	29.3708	0.0338	CTNNB1
Regulação da atividade do RAC1	5.1277	0.0193	CTNNB1; CUL3; ARHGDIB
Via de sinalização RAC1	5.1277	0.0193	CTNNB1; CUL3; ARHGDIB
Eventos de sinalização mediados por syndecan-4	5.0296	0.0204	CTNNB1; CUL3; FN1
Interações beta5 beta6 e beta8 integrina na superfície celular	20.7374	0.0476	FN1
Via de sinalização RhoA	5.1277	0.0193	CTNNB1; CUL3; ARHGDIB

Regulação da atividade RhoA	5.1278	0.0193	<i>CTNNB1</i> ; <i>CUL3</i> ; <i>ARHGDIB</i>
-----------------------------	--------	--------	----------------------------------------------

Fonte: FunRich, o autor (2020)

Várias vias celulares, incluindo a via de sinalização Wnt, estão relacionadas à metástase do câncer. Muitos estudos sugerem que a desregulação da sinalização Wnt pode levar à iniciação e à progressão do câncer em diversos tecidos, incluindo o de mama (MATSUDA et al., 2009). A cascata de fosforilação da  $\beta$ -catenina, proteína efetora *downstream* da via de Wnt, está relacionada às características de capacitação migratória das células tumorais. As vias de sinalização que promovem a manutenção celular estão desordenadas no câncer conferindo características a esta patologia: imortalização, capacidade migratória e perda da adesão celular (CROCE, 2008). A cascata de sinalização da proteína Wnt é uma via implicada na regulação de processo de crescimento celular e de formação tumoral (EL WAKIL, 2011). Cânceres são associados à ativação da via Wnt, incluindo a presença de mutações somáticas no gene *CTNNB1* (KLAUS, 2008).

Segundo Xia e Land 2007, em células deficientes em p53 e com atividade de Ras aumentada, há um aumento dos níveis intracelulares de RhoA-GTP, por consequência aumentando a formação de fibras de estresse e a migração. A GTPase RhoA está relacionada intimamente à reorganização do citoesqueleto, formação de fibras de estresse e à migração celular via ativação da polimerização da actina (JAFFE e HALL, 2005). As proteínas *CTNNB1* e *CUL3* foram relacionadas à sinalização envolvendo Rho.

As vias de sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina e Rho-GTPase são conhecidas por desempenhar papéis essenciais na transformação maligna e progressão de vários tumores, incluindo câncer gástrico. As proteínas da família Ras homóloga (Rho) -GTPase, incluindo RhoA, Cdc42 e Rac1, são conhecidas por desempenhar um papel fundamental nos mecanismos de desenvolvimento e progressão do câncer, incluindo transformação celular, proliferação, migração, invasão e metástase, regulando o citoesqueleto de actina e adesão célula-célula (Ridley, 2000, Fukata e Kaibuchi, 2001). Yoon (2016) demonstra a relação entre Rho e *CTNNB1* a moléculas inibidoras da TEM e na migração de células cancerígenas através da supressão das vias de sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina e Rho-GTPase.

A participação de Rho na via canônica de Wnt indicando que Rac1 está relacionada com o transporte de  $\beta$ -catenina entre o núcleo citoplasma, foi descrita por Wu et al., (2018). Sabe-se que Rac1 leva à fosforilação de  $\beta$ -catenina e sua translocação para o núcleo (WU et al., 2008).

Ding et al., (2011) demonstrou que Cul3 foi identificada para ser a ubiquitina ligase E3 para alguns membros da família Rho, pequenas GTPases, sendo demonstrado que RhoBTB2 é um substrato do complexo Cul3 ubiquitina ligase de mamífero. Isso sugere que o RhoBTB2 funciona como um supressor de tumor ligando e recrutamento de proteínas do complexo Cul3 ubiquitina ligase degradação. Portanto, a perda de RhoBTB2 resultará na regulação positiva de proteínas na oncogênese. Amostras e linhas celulares de câncer gástrico e da bexiga, demonstram uma alta taxa de perda de heterozigosidade de RhoBTB2 (WILKINS (2004); DEL PULGAR et al., (2005); DING et al., (2011)), essas proteínas também foram comumente relacionadas à sinalização mediada pela GTPase RAC é um regulador essencial da sinalização celular que controla os rearranjos da actina e a motilidade celular (DEL PULGAR et al., 2005)

Enquanto GTPase, Rac1 e seus efetores são mediadores bem estabelecidos na sinalização por receptores de tirosina quinase presentes na tumorigênese da mama, pouco é conhecido sobre os fatores de troca (Rac-GEFs) que mediam as respostas dos receptores ErbB, P-Rex1 é um mediador essencial para ativação do Rac1 conferindo motilidade, crescimento celular e tumorigênese dirigida por receptores ErbB em células de câncer de mama. A superexpressão de P-Rex1 no câncer de mama luminal desempenha um papel fundamental na integração de sinais dos receptores acoplados à tirosina-quinase e à proteína G, e tem sido associada a metástases em pacientes com câncer de mama (SOSA, 2010).

Rac1 e CUL3 estão associadas a um complexo de ubiquitinação com uma cascata de proteínas em função de modificar o arranjo do citoesqueleto de actina, manutenção da adesão focal contendo vinculina e proliferação celular e invasão, algumas características presentes em células do câncer (GENAU et al., 2015).

A proteína FN1 foi identificada em vias relacionadas ao citoesqueleto de actina e a interações com integrinas de superfície celular.

FN1 está envolvida na formação da matriz celular, com integrinas vinculadas com citoesqueleto, várias enzimas de sinalização, incluindo a família Src quinases, pp125 FAK, Rho GTPases e PI3 quinase, que estão envolvidas no processo de montagem da matriz. Essas mesmas enzimas de sinalização podem ser reguladas pela ligação da integrina em um processo conhecido como sinalização de integrina de fora para dentro. Assim, é possível que sinais de integrinas que regulam cinases como a pp125 FAK possam participar do processo de montagem da matriz celular (ERICKSON (2002), OHASHI et al., (2002)).

Segundo Pereira et al., (2005) a fibronectina desempenha um papel importante na adesão de muitos tipos de células. A extensão da adesão celular *in vitro* está relacionada não apenas à capacidade das células de interagir com a fibronectina ligada à matriz, quando presente, mas também à síntese ou falta de síntese de fibronectina pelas células e à falta de deposição de fibronectina sintetizada em uma matriz insolúvel ao redor das células. Muitas células malignas, independentemente de sintetizarem quantidades subnormais ou normais de fibronectina, não depositam essa fibronectina em uma matriz insolúvel circundante (PEREIRA et al., 2005).

A falta de fibronectina em torno dessas células possivelmente reflete uma ausência geral de matriz extracelular, uma vez que outros componentes da matriz, como colágeno, laminina e proteoglicano de sulfato de heparano, estão faltando concomitantemente (PEREIRA et al., 2005). As células que não possuem fibronectina na superfície celular devido à falta de deposição ou à falta de síntese podem, no entanto, aderir a matrizes de fibronectina insolúveis elaboradas por outras células, essas características celulares podem estar associadas à migração celular *in vivo* durante a embriogênese, e as mesmas características podem aumentar o potencial invasivo de células malignas. Os efeitos que a fibronectina tem sobre a adesão celular e a associação da falta de componentes da matriz extracelular com tumores pouco diferenciados e altamente metastáticos *in vivo* exigem que se conheça mais sobre os detalhes moleculares e celulares das interações das células com sua matriz circundante. Informações importantes sobre a invasão tumoral serão paralelas a esse entendimento e podem eventualmente se tornar a base para abordagens terapêuticas (PEREIRA et al., 2005).



FN1 nesse estudo apresentou uma expressão reduzida em TN em relação ao FC de log2, corroborando com a literatura. A ausência de FN1 causa instabilidade na matriz celular favorecendo a migração, uma característica de câncer de mama TN.

Com base nessa análise preliminar, se verifica que as proteínas CTNNB1, FN1 e CUL3 foram associadas a vias biológicas de importância para o desenvolvimento do câncer e que estão descritas no câncer de mama, o que demonstra a relevância de estudos adicionais que promovam a compreensão de sua expressão e funções no câncer de mama.

#### 6.2.2 Características do câncer e a relação com as proteínas diferencialmente expressas

As 22 proteínas diferencialmente expressas entre tumores TN e LB também foram avaliadas quanto ao seu envolvimento em doenças e funções, de acordo com o banco de dados do IPA (TABELA 5).

TABELA 5. RELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS PARA VALIDAÇÃO E AS CARACTERÍSTICAS DO CâNCER.

<b>Anotação de Doenças ou Funções</b>	<b>p-valor</b>	<b>Moléculas</b>
Movimento celular de linhas celulares de câncer de mama	2,51E-05	CTNNB1,GPI,S100A11
Adesão célula-célula de linhas celulares da mama	2,91E-05	ARHGDIB,CTNNB1,FN1,MYH9,S100A11
Transição epitelial-mesenquimal de linhas celulares de câncer de mama	4,04E-05	CTNNB1,FN1,GPI,NAMPT,S100A11
Migração de linhas celulares de câncer de mama	8,73E-05	ARHGDIB,BLVRA,CTNNB1,FN1,GNA13,GPI,GSTM1,MAP4,MYH9,NAMPT,SCRIB
Invasão de linhas celulares de câncer de mama	2,40E-04	ARHGDIB,BLVRA,CTNNB1,ENOPH1,FN1,GNA13,GPI,GSTM1,HLA-DRA,MAP4,MYH9,NAMPT,NNMT,PHGDH,SCRIB
Câncer de mama	4,24E-04	FN1,MYH9
Câncer de mama ou pancreático	1,85E-03	BLVRA,FN1
Propagação celular de câncer de mama	1,85E-03	FN1
TNM estágio III câncer de mama	1,85E-03	CTNNB1
Carcinoma ductal mamário infiltrado grau 3	2,01E-03	GPI,NAMPT
Hiperplasia ductal mamária	4,05E-03	ARHGDIB,BLVRA,CTNNB1,FN1,



atípica		GNA13,GPI,GSTM1,HNRNPF,MAP4,MYH9, NAMPT,NNMT,PAM16,SCRIB
Transição epitelial- mesenquimal das linhas celulares da mama	2,51E-05	CTNNB1,GPI,S100A11
Câncer de mama ou ginecológico	2,91E-05	ARHGDIB,CTNNB1,FN1,MYH9,S100A11

Fonte: IPA. O Autor (2020)

Em geral, as principais funções observadas são relacionadas a processos biológicos que conferem motilidade celular e que, portanto, são característicos da progressão tumoral.

A relação do microambiente tumoral e a imunologia estão diretamente relacionadas com progressão metastática do câncer de mama, níveis elevados de Células T foram descritos no sangue periférico, linfonodos, amostras de tumores e ascites de pacientes com diferentes tipos de câncer, sugerindo um papel para essas células na progressão do câncer (TRIULZI et al., 2012).

Diversas moléculas como HER2, inibidores de CDK, miR-17-92, Wnt/  $\beta$ -catenina, estão envolvidas em importante e vários processos celulares, incluindo o ciclo celular progressão e apoptose (KLAUS 2008, TRIULZI et al., 2012, SHAH et al., 2013).

Evidências sugerem que as células tumorais metastatizam cooptando as redes transcricionais de células-tronco, embora os fundamentos moleculares desse processo sejam pouco compreendidos. SHAH et al., (2013) descreve que o gene do grupo de alta mobilidade A1 (*HMGA1*) promove a progressão metastática em células de tumores TN do câncer de mama (MDA-MB-231) reprogramando as células cancerígenas para um estado semelhante a celular não diferenciadas (SHAH et al., 2013).

A transição epitélio mesenquimal (TEM) é um processo normal de desenvolvimento durante o qual as células epiteliais perdem características epiteliais e adquirem propriedades mesenquimais, resultando em maior mobilidade. No entanto, a TEM também é um importante mecanismo na progressão tumoral, contribuindo para a invasão tumoral e disseminação metastática. TEM está intimamente relacionada ao câncer de mama triplo negativo. A transição epitélio mesenquimal é induzida por vias de sinalização

envolvendo TGF $\beta$ 1 e Wnt, em parte através da regulação de fatores de transcrição incluindo Snail, Slug, Twist e ZEB1 / 2 (GWAK et al., 2014)

Estudos sobre os aspectos imunológicos que envolvem o microambiente tumoral do subtipo triplo negativo ainda são escassos na literatura, o que ressalta a importância de novos estudos (GUEMBAROVSKI et. al, 2013).

Em concordância com estes aspectos, é relevante ressaltar que as principais proteínas diferencialmente expressas entre os subtipos TN e LB possuem funções relacionadas a vias e funções biológicas que proporcionam às células tumorais a capacidade migratória e invasiva necessária para a disseminação do tumor.

A proteína CTNNB1 foi identificada em grande parte das funções relacionadas ao câncer de mama (GEYER, 2011), em especial o subtipo TN (GEYER, 2011), ressalta a importância desta proteína no desenvolvimento e progressão da doença.

FN1, por sua vez, também foi relacionada ao câncer de mama, com destaque na propagação celular. Essa proteína tem uma função na adesão e nas vias relacionadas a matriz extracelular, cujas interações celulares são importantes nas fases posteriores do tumorigênese da mama, especificamente durante a invasão e metástase (GIUSSANI et al., 2015). FN1 é essencial para o crescimento de células, e quando associada à COL1 forma uma rede fibrilar especial associada à invasão no tecido tumoral, estruturas que denominamos canais tubulares para invasão (KAARIANEN et al., 2006).

O crescimento metastático está associado à formação de uma rede complexa por quatro proteínas da matriz extracelular específica (MEC): colágeno-I (COL-I), fibronectina 1 (FN1), periostina (POSTN), versican (VCAN), que parecem regular a adesão, migração, crescimento e angiogênese, essas proteínas mostraram expressão coordenada também em metástases de câncer de mama (SOIKKELI et al., 2010). No tumor de origem a expressão desse complexo de associação proteica é diminuído e quando a metástase se estabelece no novo sítio a expressão dessas proteínas aumenta (SOIKKELI et al., 2010).

Nas funções relacionadas à motilidade celular, um processo regido por variações espaciais e temporais nos vários reguladores do citoesqueleto de actina, a  $\beta$ -catenina pode desempenhar uma função importante na migração e

invasão tumoral (RAMIS-CONDE et al., 2008). Além disso, a sinalização CTNNB1 aberrante pode cooperar com vários outros oncogenes para promover o desenvolvimento de carcinomas agressivos (ANASTAS e MOON, 2013).

A  $\beta$ -catenina é uma proteína intracelular associada à citoesqueleto de actina. As caderinas-E se ligam à  $\beta$ -catenina para formar um complexo que pode interagir tanto com as células vizinhas para formar ligações e com o citoesqueleto da célula. Quando as células se separam, a  $\beta$ -catenina é liberada no citoplasma, direcionados à degradação e desregulados. Neste processo, existem múltiplos complexos de proteínas envolvidos que interagem com  $\beta$ -catenina e E-caderina. A superexpressão de  $\beta$ -catenina está relacionada a instabilidade de adesão celular (RAMIS-CONDE et al., 2008).

### 6.2.3 Reguladores *Upstream* e relação com as proteínas diferencialmente expressas

O programa IPA também foi utilizado para relacionar as proteínas diferencialmente expressas aos seus respectivos reguladores *upstream* (TABELA 6).

TABELA 6. GENES DE PREDIÇÃO DE ATIVAÇÃO

Regulador <i>Upstream</i>	Tipo de molécula	Escore z ativação	p-valor	Moléculas alvo no conjunto de dados
MYCN	regulador de transcrição	1,980	1,41E-04	FN1,MAP4,MYH9,PHGDH
MYC	regulador de transcrição	1,206	2,26E-02	CTNNB1,FN1,GPI,MAP4
Tretinoína	Química endógena de mama	1,033	1,70E-02	CTNNB1,FN1,GNA13,HNRNPF, MYH9
TP53	regulador de transcrição	0,982	3,79E-07	CTNNB1,FN1,GNA13,GPI,GSTM1, MAP4,ME1,MYH9,NAMPT,PHGDH, SCRIB
IL1B	citocina	0,882	1,21E-02	CTNNB1,FN1,HLA-DRA,NAMPT
Acetato de miristato de forbol	Droga	0,577	9,66E-05	CTNNB1,CUL3,GSTM1,HLA-DRA,HNRNPF,MYH9,PHGDH
HGF	Fator de crescimento	0,362	1,06E-04	CTNNB1,CUL3,FN1,GNA13, NAMPT
SB203580	Inibidor químico de kinase	0,218	9,51E-04	ARHGDIB,FN1,GPI,NAMPT
TNF	citocina	0,033	3,21E-05	ARHGDIB,BLVRA,CTNNB1,FN1, HLA-DRA,MYH9,NAMPT, NNMT,PHGDH

FONTE:IPA. O Autor (2020)

Nesta análise, foram identificados especialmente MYC, TP53 e TNF (fator de necrose tumoral), os quais desempenham funções na progressão do câncer, incluindo o de mama (MA et al., 2012, XU, 2015, Wang et al., 2017)

O proto-oncogene Myc é um potente ativador de tumorigênese, promovendo a proliferação celular necessária ao desenvolvimento e progressão tumoral (XU, 2015) e se encontra desregulado em uma variedade de cânceres (DANG, 2012). O gene *c-MYC* é altamente expresso em tumores de mama subtipo TN (CHANDRIANI, 2009), isso sugere a importância de sua função no desenvolvimento do câncer de mama TN. Myc é um efetor à jusante da  $\beta$ -catenina, regulando-a positivamente no câncer colorretal (HE, 1998). No câncer de mama, a  $\beta$ -catenina é regulada pela expressão de Myc de maneira variada de acordo com o subtipo, sendo descrito por Xu (2015) que linhagens celulares de tumor TN expressam concomitantemente altos níveis de  $\beta$ -catenina e c-Myc. No estudo de Benaud e Dickson (2001) a adesão celular à fibronectina1 foi relacionada com a expressão de c-Myc a ligação das células à fibronectina melhorou específica e rapidamente a indução de c-Myc, em comparação com as demais células. Os experimentos indicaram que os níveis de c-Myc foram transitoriamente aumentados após a adesão e a disseminação das células em fibronectina. Uma análise mais precisa da dinâmica da indução de c-Myc por fibronectina mostrou que os níveis de m-RNA de c-Myc começam a aumentar aos 30 minutos após a adesão à fibronectina, atingindo o pico em 1 h (BENAUD e DICKSON 2001)

No mesmo estudo, CTNNB1 e FN1 foram relacionados à MYC, de modo que sua expressão aumentada no TN resultou na predição de MYC ativado (z-score positivo). Portanto, MYC pode ser um regulador positivo dessas proteínas, o que corrobora com Benaud e Dickson (2001) que dercrevem a fibornectina1 relacionada a expressão de c-Myc, em Xu (2015) relata que  $\beta$ -catenina é regulada pela expressão de Myc de maneira variada de acordo com o subtipo.

TN frequentemente apresentam mutações no *TP53*, resultando na perda do ponto de verificação G1 e na dependência do ponto de verificação cinase 1 (Chk1) para interromper as células em resposta a danos no DNA. A p53 desempenha um papel fundamental na interrupção da progressão do ciclo

celular na presença de estresse genotóxico, para manter a integridade do genoma (MA et al., 2012). Chiche (2017) demonstrou que os tumores TN geralmente exibem sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina ativada e a maioria tem função p53 prejudicada. A perda de p53 em camundongos modelos para TN (K5 $\Delta$ N $\beta$ cat) determinou uma expansão precoce de células-tronco mamárias e estimulou a formação de tumores triplos negativos. Em particular os tumores com deficiência de p53 expressaram altos níveis de integrinas e componentes da matriz extracelular. Eles também superexpressaram o receptor de tirosina quinase Met, uma característica dos tumores TN humanos (CHICHE 2017).

A proteína induzida por fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é um regulador negativo essencial da imunidade inata e adaptativa (SUN 2008).

Wang (2017) descreveu que a expressão ectópica de TNF- $\alpha$  inibiu a expressão de  $\beta$ -catenina, ciclina D1 e c-Myc em células de câncer de mama. Todos esses resultados sugerem que o TIPE2 inibe a proliferação e a tumorigênese no câncer de mama, talvez através da supressão da Via de sinalização Wnt /  $\beta$ -catenina (WANG, 2017).

Liu et al., (2017) demonstraram que TNF- $\alpha$  foi superexpresso em amostras clínicas de células hepáticas, a maior expressão foi frequente em tumores agressivos. *In-vitro*, TNF- $\alpha$  promoveu a migração e invasão de células de câncer hepático, principalmente associada a via de indução sinérgica de fibronectina.

A proteína CUL3 foi relacionada a fatores de crescimento em hepatócitos (HGF) e seu receptor (Met), conhecido por auxiliar o crescimento e a invasão, recentemente foi associado com o desenvolvimento no câncer de mama (LEE et al., 2008).

#### 6.2.4 Biomarcadores preditos e as proteínas diferencialmente expressas

As 3 proteínas diferencialmente expressas entre tumores TN e LB também foram analisadas quanto ao seu potencial como biomarcadores do câncer. A Tabela 7 apresenta o resultado obtido para as proteínas CTNNB1, FN1 e CUL3.

TABELA 7. RELAÇÃO PROTEÍNA X BIOMARCADORES PREDITOS

<b>Símbolo</b>	<b>Localização</b>	<b>Família</b>	<b>p-value</b>	<b>Aplicação do Biomarcador</b>
CTNNB1	Núcleo	Regulador de transcrição	3,65E-02	Diagnóstico, progressão da doença, eficácia, prognóstico
CUL3	Núcleo	Enzima	3,76E-02	
FN1	Espaço Extracelular	Enzima	3,94E-02	Diagnóstico, eficácia, prognóstico, aplicação não especificada

FONTE:IPA. O Autor (2020)

O estudo molecular utilizando um biomarcador especificamente associado à agressividade e metástase de tumores é uma abordagem eficaz para a detecção precoce e o diagnóstico diferencial de câncer de mama de alto risco (ZHOU 2015)

CTNNB1 é descrita como um biomarcador para câncer colorretal (CHIAROTTO 2017), o estudo de Saponaro (2019) descreve CTNNB1 como biomarcador, que se apresentou superexpresso nas amostras TN, corroborando com os resultados observados no presente estudo.

A fibronectina é abundantemente expressa em vários tipos de tumores malignos e está associada a um fenótipo invasivo e metastático (ZHOU 2015), Ruiz-Garcia 2010 e sugeriu que a dosagem de fibronectina 1 / CXCL9 numa análise diferencial da expressão gênica é uma boa abordagem para selecionar candidatos a biomarcadores para configurar exames de sangue para detecção de câncer.

A aplicação de novos biomarcadores para diagnóstico e auxílio na terapêutica do câncer de mama é de notável importância para aprimorar a eficácia do tratamento da doença. No presente estudo, CTNNB1 e FN1 foram identificados com possíveis biomarcadores, CUL3 não apresenta estudos que a relacionem como um biomarcador para o câncer de mama.

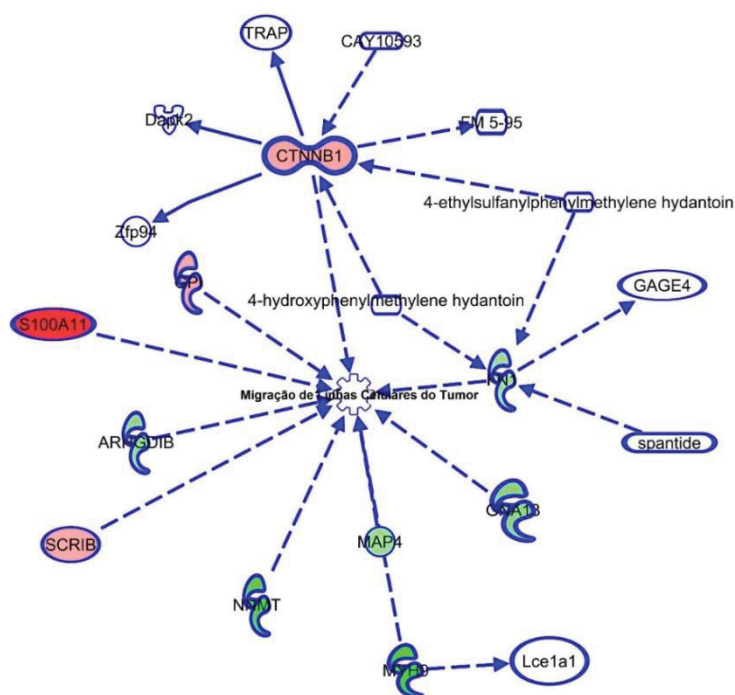
A família das culinas já foi relacionada com outros cânceres. Cul3 é uma ubiquitinase envolvida em importantes funções da tumorigênese (LOIGNON et al., 2009, HOU et al., 2015), expressão de CUL1 a caracterizou como um dos biomarcadores significativos que pode ser usado para discriminar melanoma segundo Zhang (2012) e CUL4 foi descrita como superexpressa em vários cânceres humanos, incluindo câncer de mama, carcinomas hepatocelulares e mesoteliomas. A amplificação e superexpressão da CUL4 desempenha um

papel oncogênico na carcinogênese, o que torna CUL4 um alvo para terapias anticâncer (JIA 2011, XIE et al., 2013, CHENG et al., 2014).

#### 6.2.5 Relação das proteínas diferencialmente expressas e a migração celular

Considerando a extensa relação das proteínas avaliadas neste estudo com funções celulares envolvidas na progressão tumoral, as 22 proteínas diferencialmente expressas entre os tumores TN e LB também foram analisadas no programa IPA através do recurso “Análise fenomenológica interpretativa” (do inglês - *Interpretative phenomenological analysis*), através do qual foram geradas vias de correlação com o processo de migração celular. A figura 5 apresenta a relação entre as proteínas identificadas no presente estudo e outras relacionadas de forma direta e/ou indireta associadas a este *hallmark*.

FIGURA 5. RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS PRESENTES DA COMPARAÇÃO T<sub>TN</sub>X T<sub>LB</sub> E A MIGRAÇÃO CELULAR



NOTA: Relação proteica com migração

FONTE: O Autor (2020)

Nota: Linhas tracejadas representam relação indireta com a migração. Coloração em verde representa as proteínas com FC↓ que 0,58 proteínas em vermelho FC↑ que 0,58. A intensidade da coloração demonstra que a proteína em questão está com uma expressão mais significativa quando comparadas a proteínas com FC↑ ou FC↓.



Muitos estudos sugerem que a desregulação da sinalização Wnt devido a superexpressão de CTNNB1, pode levar ao início da progressão do câncer em diversos tecidos, caracterizando um cenário adaptativo para a migração, crescimento celular e de formação tumoral, incluindo o câncer de mama (MATSUDA et al., 2009, EL WAKIL, 2011). Essa variação de expressão atribuída à sinalização Wnt canônica e oncogênica, é ativada no Triplo Negativo (LIN, 2000), através da compreensão da função biológica da ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina. É possível que CTNNB1 seja um potencial alvo terapêutico para o câncer de mama TN (XU, 2012),

Em relação a FN, sua função para o crescimento de células e formar uma rede fibrilar especial associada à invasão no tecido tumoral as estruturas envolvidas são denominadas canais tubulares para invasão (KAARIAINEN et al., 2006). FN1 está envolvida na adesão e migração celular, na cicatrização e na defesa do hospedeiro (STEFFENS, 2012), sua função, nas adesões basais corroboram com a característica migratória da célula metastática, conferindo a característica da agressividade desse subtipo de câncer de mama do subtipo TN.

Estudos analisando o envolvimento de GSTM1, GSTT1 e polimorfismos GSTP1 indicaram que indivíduos portadores de genótipos variantes de GST são menos capazes de desintoxicar os metabólitos de medicamentos e agentes cancerígenos alvos para terapia usados no tratamento de câncer colorretal, câncer de bexiga, osteossarcoma, câncer de mama e outros (ZHANG et al., 2012; DJUKIC et al., 2013; DUGGAN et al., 2013; VREULS et al., 2013; KAP et al., 2014).

MYL9 refere-se polipeptídeo leve regulador da miosina 9, que pode desempenhar funções importantes em vários cânceres humanos, sendo sua expressão e fosforilação descrita como aumentada no câncer de mama (PENG et al., 2016).

Um alto nível de expressão de NNMT está associado a uma baixa sobrevida e baixa resposta a quimioterapia em pacientes com câncer de mama (Wang 2019).



### 6.3 PREDIÇÕES DE INTERAÇÃO PROTEICA

As proteínas diferencialmente expressas entre tumores TN e LB foram pesquisadas quanto as suas interações com demais proteínas (APÊNDICE 6), utilizando o programa STRING 11.0 (do inglês - *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), disponível em <http://string-db.org> (SZKLARCZYK et al., 2015). As proteínas CTNNB1 e FN1 foram selecionadas para maiores descrições devido à associação com a migração celular, um processo fundamental para a metástase, e com reguladores *upstream* com funções reconhecidas na progressão do câncer; a proteína CUL3 também foi selecionada por apresentar superexpressão em tumores TN e por ser uma ubiquitinase envolvida em importantes funções da tumorigênese (LOIGNON et al., 2009, HOU et al., 2015).

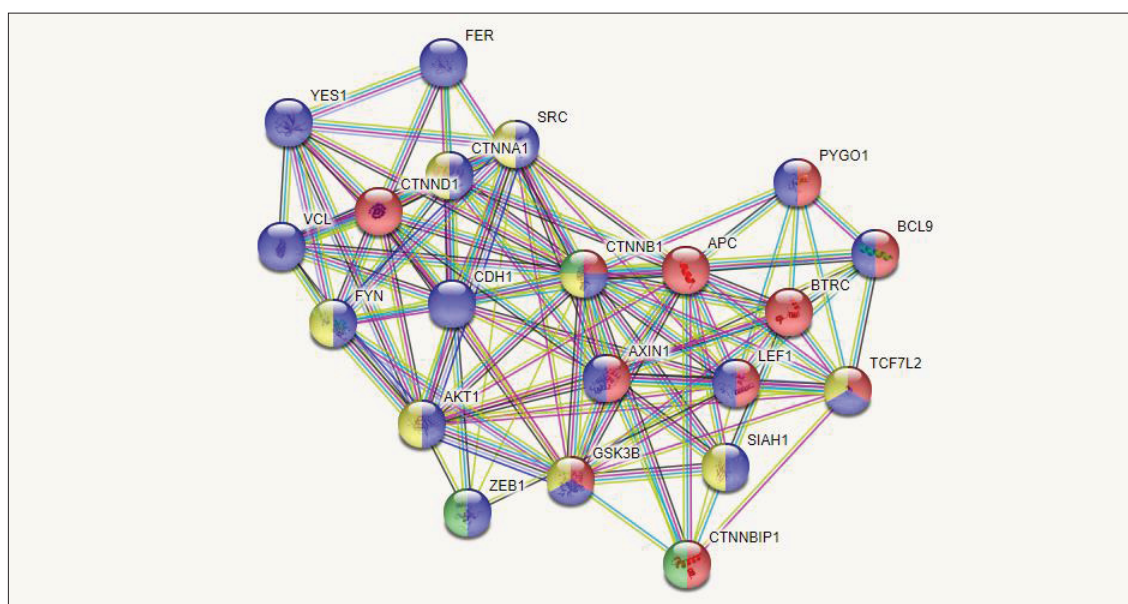
#### 6.3.1 Proteína $\beta$ - catenina 1 (CTNNB1)

A alteração na via da  $\beta$ -catenina influencia a migração de células no câncer de mama (PROSPERI, 2010). O acúmulo anormal e a mutações da  $\beta$ -catenina estão associados à ativação oncogênica (CURTIN, 2010). A forma ativa da  $\beta$ -catenina pode se ligar ao fator estimulador do fator das células T (TCF) / linfóide (LEF) e desenvolver pesquisas para os genes alvo, como c-Myc, MMP-2 e ciclina D1 (SHTUTMAN, 1999).

A  $\beta$ -catenina é fundamental no câncer de mama, porque tem uma dupla função tanto em complexos de adesão quanto na regulação da transcrição em várias vias de transdução de sinal (SAPONARO, 2019). Segundo Geyer (2011), amostras de pacientes com câncer de mama revelaram maior expressão de Myc em subtipos de câncer de mama basais, subtipo mais relacionado ao TN, sendo observada maior expressão nuclear de  $\beta$ -catenina concomitantemente em amostras de TN.

De acordo com informações dos bancos de dados GO v 2.0 e MSigDB v. 6.2, utilizados através do STRING v. 11.0 (FIGURA 6), essa proteína está envolvida na via de sinalização Wnt, diferenciação celular, regulação da proliferação mesenquimal e adesão celular.

FIGURA 6. REDE DE INTERAÇÃO PROTEICA CTNNB1



Legenda: Correlações realizadas no STRING: verde - relação genética, vermelho - fusões de genes, azul - co-ocorrência de genes, ciano - interações conhecidas em bancos de dados com curadoria, rosa - interações conhecidas determinado experimentalmente, amarelo - mineração de texto, preto- co-expressão e roxo - homologia proteica

FONTE: O Autor (2020)

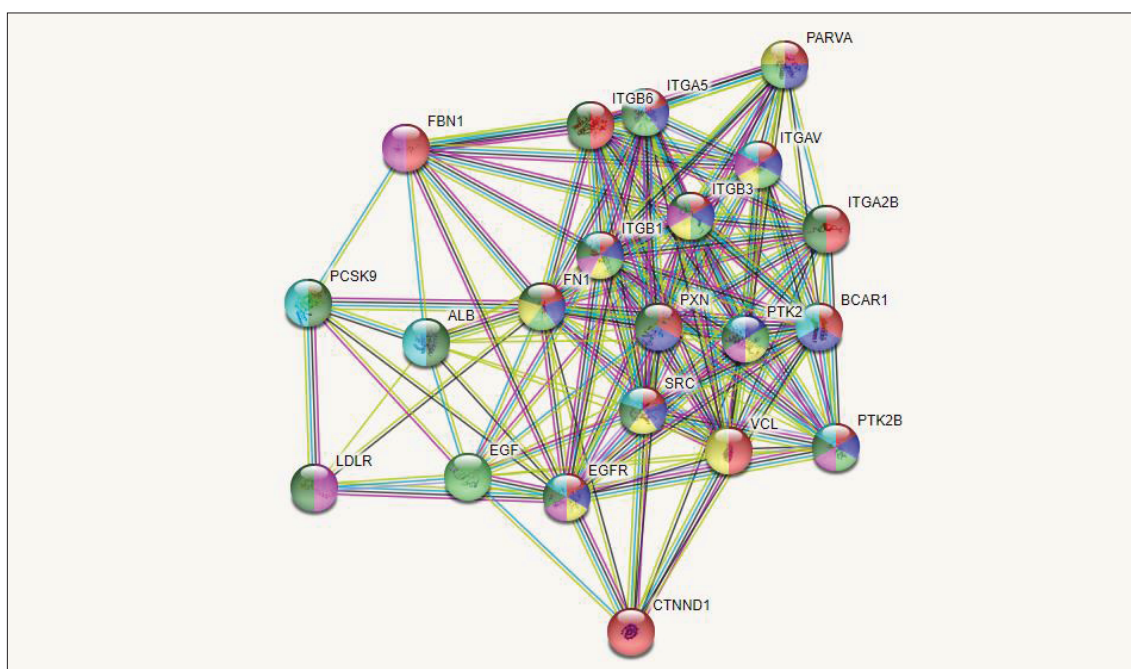
### 6.3.2 Proteína Fibronectina 1 (FN1)

A adesão celular é um aspecto comum em vários processos biológicos, incluindo interações célula-célula e célula matriz celular (MEC). A adesão celular é mediada por várias famílias distintas de receptores direcionados à MEC, bem como ao crescimento, diferenciação e migração celular. O processo de metástase requer inicialmente a interrupção da interação da adesão entre o tumor e as células adjacentes ou a matriz extracelular, resultando na liberação de células neoplásicas, seguida por uma adesão celular aumentada em momentos posteriores (LIU et al., 2015).

Verificou-se que a FN1 está envolvida na adesão e migração celular, na cicatrização e na defesa do hospedeiro (STEFFENS, 2012). A expressão da FN1 é diretamente regulada pelo microRNA-206, que demonstrou estar associado a tipos de câncer metastáticos, incluindo o de mama (KONDO, 2008; ADAMS, 2009). O miRNA-206 inibe o crescimento celular no câncer de mama, atuando no receptor de estrogênio 1. Além disso, verificou-se que o FN1 está correlacionado com a resistência a medicamentos nas células cancerosa (MUTLU et al., 2012).

De acordo com os bancos de dados GO v. 2.0 e MSigDB v. 6.2 através do STRING v. 11.0 (FIGURA 7), essa proteína está envolvida em processos de adesão e migração celular, angiogênese e morfogênese celular, diferenciação celular, regulação de apoptose, estresse celular, via de sinalização Wnt, metástase em linfonodo e resistência a drogas, aspectos notáveis que estão envolvidos na maior agressividade do subtipo TN quando comparado a tumores LB.

FIGURA 7. REDE DE INTERAÇÃO PROTEICA FN1



Legenda: Correlações realizadas no STRING: verde - relação genética, vermelho - fusões de genes, azul - co-ocorrência de genes, ciano - interações conhecidas em bancos de dados com curadoria, rosa - interações conhecidas determinado experimentalmente, amarelo - mineração de texto, preto- co-expressão e roxo - homologia proteica

FONTE: O Autor (2020)

### 6.3.3 Proteína Culina 3 (CUL3)

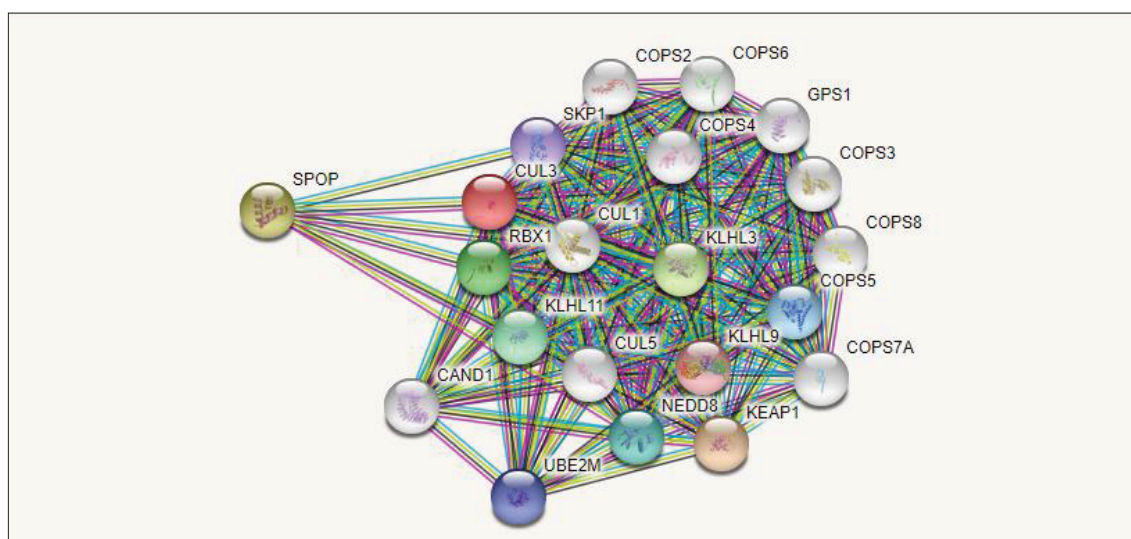
A CUL3 é uma ubiquitinase, envolvida na regulação de diversas proteínas e, conseqüentemente, em diversos processos biológicos (GENAU et al., 2015).

Hou et al. (2015) observaram que, em comparação com tecidos normais, as amostras de câncer de mama apresentaram expressão significativa de CUL3 e a correlacionaram a metástases distantes e à diminuição da sobrevida global dos pacientes, a superexpressão de CUL3 em células de câncer de mama induziu a proliferação, transição epitelial mesenquimal (TEM), migração,

invasão *in vitro* e capacidades tumorigênicas e metastáticas *in vivo*, por outro lado, o silenciamento de CUL3 reverteu esses eventos em células invasivas de câncer. A regulação da proteína CUL3 também tem sido associada a um prognóstico desfavorável no câncer de bexiga e de fígado (GENSCHIK, 2013).

Segundo as análises nos bancos de dados GO v. 2.0 e MSigDB v. 6.2 através do STRING v. 11.0 (FIGURA 8), a proteína CUL3 está relacionada a processos como: Susceptibilidade a estresse oxidativo, progressão da carcinogênese, apoptose, movimentação celular (migração e invasão), diferenciação celular, controle e progressão do ciclo celular e proliferação, invasão relacionada a alterações do citoesqueleto, além de estar relacionada à via de HIF-1 (estresse oxidativo).

FIGURA 8. REDE DE INTERAÇÃO PROTEICA CUL3



Legenda: Correlações realizadas no STRING: verde - relação genética, vermelho - fusões de genes, azul - co-ocorrência de genes, ciano - interações conhecidas em bancos de dados com curadoria, rosa - interações conhecidas determinadas experimentalmente, amarelo - mineração de texto, preto- co-expressão e roxo - homologia proteica

FONTE: O Autor (2020)

As análises preditivas de interações proteicas permitem ampliar o conhecimento sobre as moléculas que podem atuar direta e indiretamente em funções relacionadas. Segundo Zhao et al., (2010) e Fkih M'hamed (2015) análise exploratória baseada na via *in silico* de perfis de expressão são realizados para identificar potenciais biomarcadores, podem afetar vias críticas conducentes à formação e progressão do câncer de mama, um mecanismo potencialmente importante que merece mais investigações.

As predições obtidas ressaltam a relevância funcional das proteínas CTNNB1, FN1 e CUL3 na tumorigênese mamária, especialmente em aspectos relacionados à capacidade invasiva e metastática do tumor, de importância em tumores TN. Assim, este estudo sugere FN1 e CUL3, além de CTNNB1 (já reconhecida no câncer de mama), como potenciais alvos para estudos adicionais direcionados para a avaliação funcional dessas proteínas em funções envolvidas na metástase do câncer de mama. Para tanto, inicialmente se faz necessária a comprovação de sua expressão diferencial em subtipos contrastantes do câncer de mama, como o TN e LB, selecionados no presente estudo.

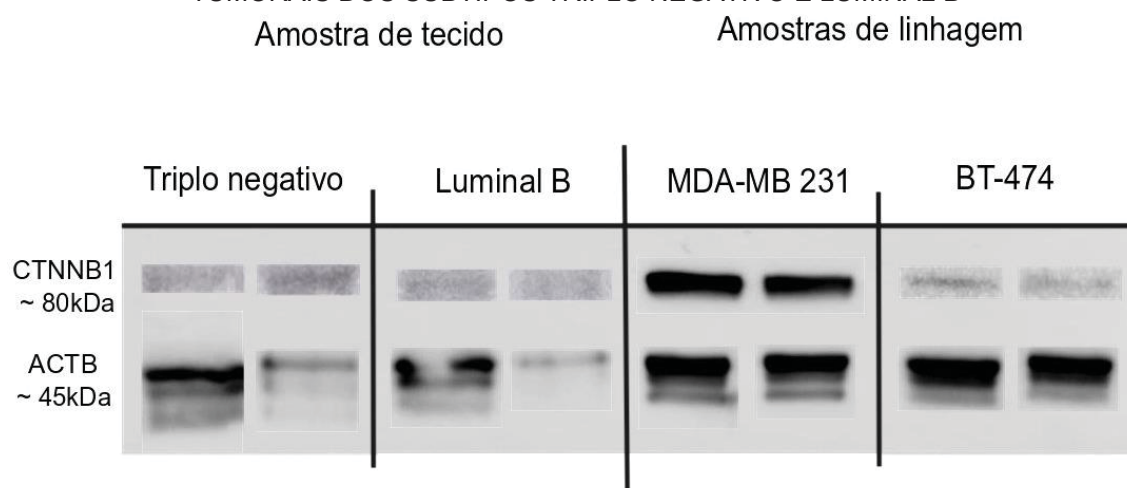
#### 6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS PROTEÍNAS $\beta$ -CATENINA 1, FIBRONECTINA 1 E CULINA 3 NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B

A avaliação da expressão proteica diferencial para as proteínas CTNNB1, FN1 e CUL3 foi realizada através do método de *Western Blotting* (WB), utilizando os mesmos extratos proteicos dos tecidos analisados por espectrometria de massas e também extratos proteicos obtidos a partir das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 (TN) e BT-474 (LB).

##### 6.4.1 Avaliação da expressão de $\beta$ -Catenina 1 em tumores TN e LB

A proteína CTNNB1 apresentou um aumento de expressão, superior a 1,5 *Fold Change* (FC) de log2 no tumor primário de mama do subtipo TN em relação ao LB, de acordo com a análise proteômica por espectrometria de massas. A figura 9 e o gráfico 1 indicam a expressão diferencial da proteína CTNNB1 nestes subtipos tumorais, utilizando extratos proteicos de tecidos e linhagens tumorais, os géis são apresentados no apêndice 7.

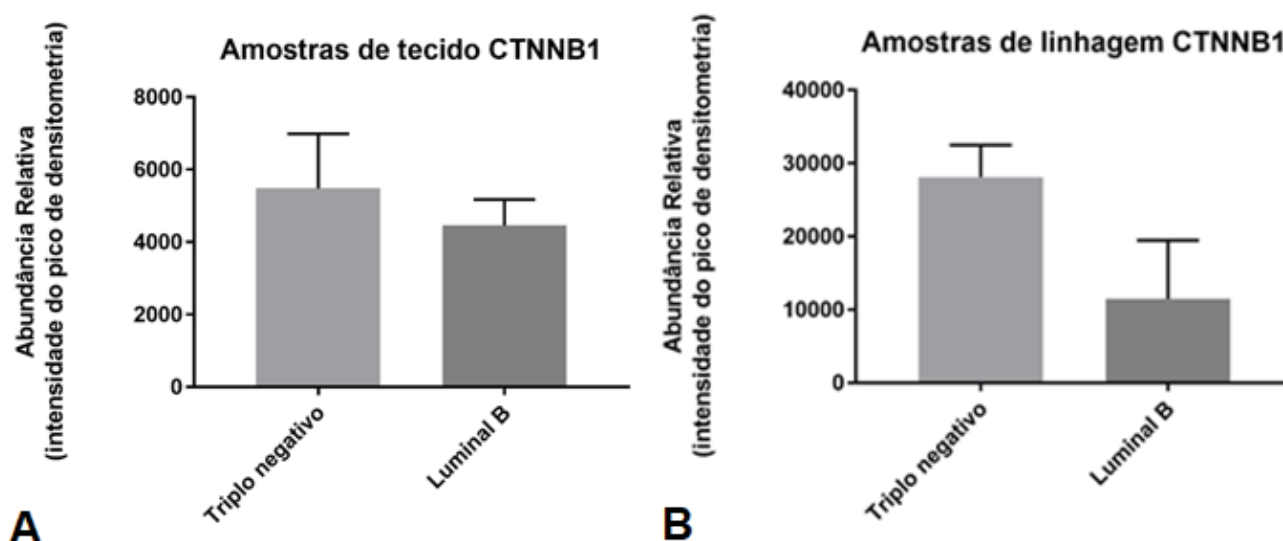
FIGURA 9 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  $\beta$ -CATENINA EM TECIDOS E LINHAGENS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B



NOTA: Gel com marcação de  $\beta$ -catenina ~80kDa e controle de  $\beta$ -actina em ~45kDa. As linhagens MDA-MB-231 e BT-474 pertencem aos subtipos tumorais triplo negativo e luminal B, respectivamente.

FONTE: O Autor (2020)

GRÁFICO 1 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DA PROTEÍNA  $\beta$ -CATENINA EM TECIDOS E LINHAGENS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B



NOTA: A intensidade da banda foi normalizada pela expressão do controle realizado com  $\beta$ -actina. As análises foram realizadas utilizando as duas bandas das amostras de tecido para quantificar e comparar a abundância relativa entre os subtipos, as duas bandas das amostras de linhagem (MDA-MB-231 e BT-474) foram utilizadas para quantificar e comparar a abundância relativa, obtidas utilizando o programa ImageJ

FONTE: O Autor (2020)

Observou-se a expressão diferencial de CTNNB1 entre os tumores TN e LB, sendo 0,7 maior no FC de log2 no Triplo Negativo quando comparado ao Luminal B, dados de análise *in silico*. Na linhagem MDA-MB-231 (TN), obteve-



se o dobro de expressão CTNNB1 (no FC de log2) em relação à BT-474 (LB) após a quantificação no ImageJ. Os dados avaliados neste estudo indicam maiores níveis proteicos de CTNNB1 em tumores TN, o que concorda com os estudos de Lin (2000), Ramis-Conde et al., (2008), Chiche (2017) Saponaro (2019).

Estudos como os de Khramtsov (2010) e Dey (2013) discutem a alta expressão citoplasmática de  $\beta$ -catenina e sua associação à alta taxa de proliferação da doença em tumores de mama RE e HER2 negativos e ao pior resultado no tratamento deles. A variação de expressão é atribuída à sinalização Wnt canônica e oncogênica, ativada no Triplo Negativo (LIN, 2000). A ativação da via canônica de Wnt/  $\beta$ - catenina é descrita em um subgrupo de câncer de mama invasivo de fenótipos TN (GEYER, 2011). CTNNB1 desempenha funções importantes na regulação do desenvolvimento da tumorigênese mamária através da sua associação com a proteína E-caderina e sua atuação na adesão celular, regulação de células-tronco mamárias e na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (KHRAMTSOV, 2010). A proteína Wnt 11, por exemplo, impede a fosforilação e a degradação da  $\beta$ -catenina pela destruição de GSK3b/APC/complexo de axina; assim, a  $\beta$ -catenina citosólica e nuclear acumulada pode se ligar aos fatores de transcrição alvo, resultando em sinais de ativação que são importantes para a proliferação e a remodelação da matriz extracelular MEC (CLEVERS, 2006).

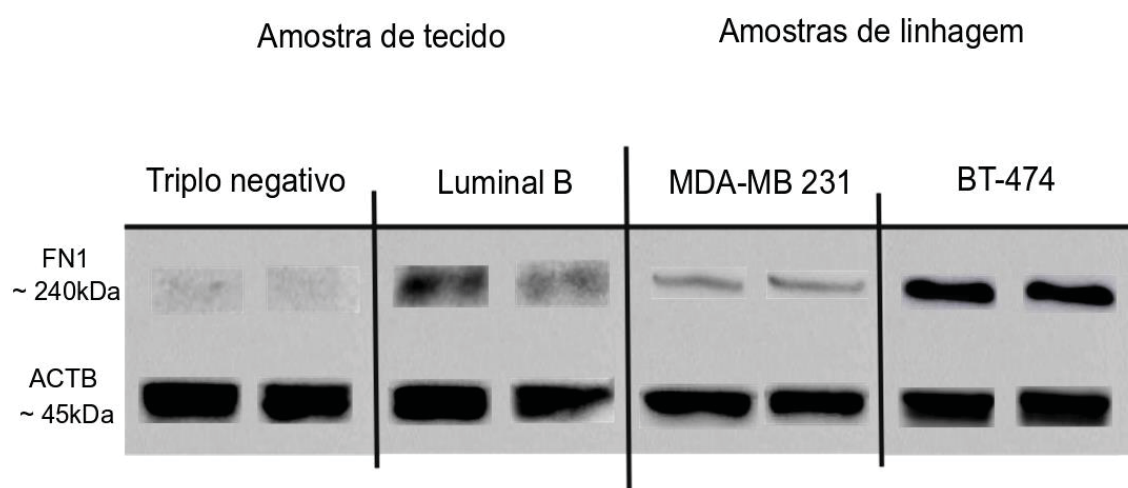
Em outros tipos de câncer, como o de cólon, foi observada uma forte correlação de atividade e alta expressão entre  $\beta$ -catenina e a ciclina D1 em linhagens celulares e amostras de tecido tumoral, sendo considerada uma característica de mal prognóstico da doença (PRASAD, 2007). Através da compreensão da função biológica da ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina, é possível que CTNNB1 seja um potencial alvo terapêutico para o câncer de mama TN (XU, 2012), sendo essa proteína considerada como marcador para mal prognóstico em tumores TN (LIN, 2000; XU, 2012; DEY, 2013). Neste sentido, é de relevância o estudo de CTNNB1 e suas interações moleculares em tumores TN, pois a ampliação do conhecimento acerca de sua funcionalidade pode fornecer maior embasamento para novos alvos terapêuticos para esse subtipo do câncer de mama. Em especial, para muitas anotações funcionais relacionadas a CTNNB1 (conforme a tabela 05) também foram observadas as

proteínas FN1 e CUL3, além de outras diferencialmente expressas entre os subtipos tumorais TN e LB e que têm relevância no câncer, como S100A1.

#### 6.4.2 Avaliação da expressão de Fibronectina 1 em tumores TN e LB

A proteína FN1 foi observada com expressão inferior a 1,5 (FC de log2) no tumor primário de mama do subtipo TN em relação ao LB, de acordo com a análise proteômica por espectrometria de massas. A figura 10 e o gráfico 2 indicam a expressão diferencial da proteína FN1 nestes subtipos tumorais, utilizando extratos proteicos de tecidos e linhagens tumorais, os géis são apresentados no apêndice 9.

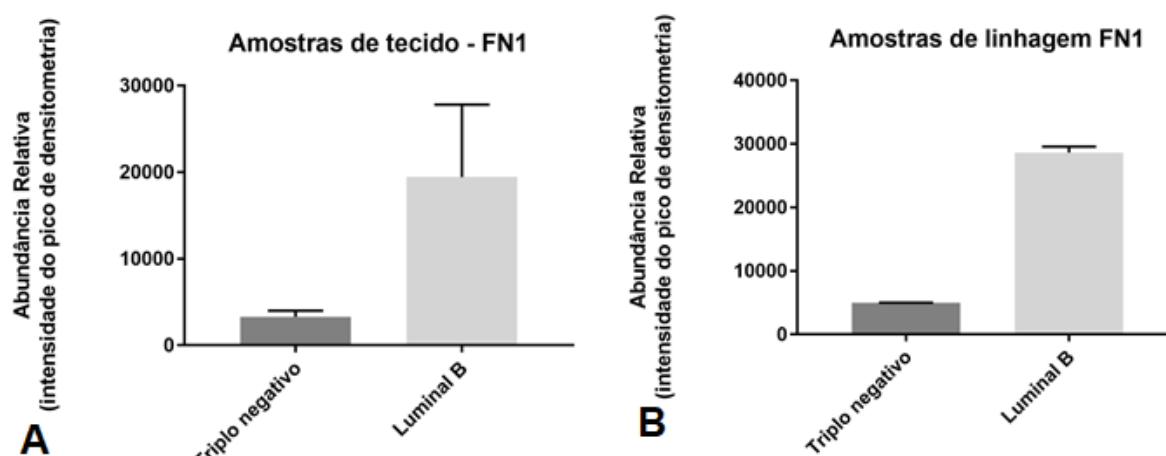
FIGURA 10 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FIBRONECTINA 1 EM TECIDOS E LINHAGENS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B



NOTA: Gel com marcação de Fibronectina 1 ~240kDa e controle de  $\beta$ -actina em ~45kDa. As linhagens MDA-MB-231 e BT-474 pertencem aos subtipos tumorais triplo negativo e luminal B, respectivamente.

FONTE: O Autor (2020)

GRÁFICO 2 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DA PROTEÍNA FIBRONECTINA 1 EM TECIDOS E LINHAGENS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL B





NOTA: A intensidade das bandas proteicas foi normalizada pela expressão do controle realizado com  $\beta$ -actina. As análises foram realizadas utilizando as duas bandas das amostras de tecido para quantificar e comparar a abundância relativa entre os subtipos, as duas bandas das amostras de linhagem (MDA-MB-231 e BT-474) foram utilizadas quantificar e comparar a abundância relativa, obtidas utilizando o programa ImageJ.

FONTE: O Autor (2020)

Com base nesta análise, se evidencia que a expressão de FN1 é menor em cerca de 0,6 no FC de log2 no subtipo tumoral TN em relação ao LB, dados de análise *in silico*. Na linhagem BT-474 (LB), obteve-se o triplo de expressão (FC de log2) FN1 em relação à MDA-MB-231 (TN) após a quantificação no ImageJ. A expressão de FN1 em tumores TN apresenta um aumento de fibronectina, uma característica da transição epitelial para mesenquimal, está associado a câncer de mama e metástase de alto risco, presente em células de metástase (ZHOU 2015), essa proteína tem uma função na adesão e nas vias relacionadas a matriz extracelular, cujas interações celulares são importantes nas fases posteriores do tumorigênese da mama, especificamente durante a invasão e metástase (GIUSSANI et al., 2015).

Na tumorigênese, a TEM pode conferir às células cancerosas habilidades migratórias e de sobrevivência aprimoradas, sendo considerada como a primeira e principal etapa na metástase do câncer. Quando o processo de TEM é acionado, as células epiteliais perdem a expressão da proteína adesiva intercelular E-caderina e passam a expressar marcadores mesenquimais, como a FN1 (CRAENE, 2013).

A FN1 tem sido frequentemente utilizada como um dos marcadores mesenquimais cuja expressão é fortemente aprimorada no processo TEM (CRAENE, 2013).

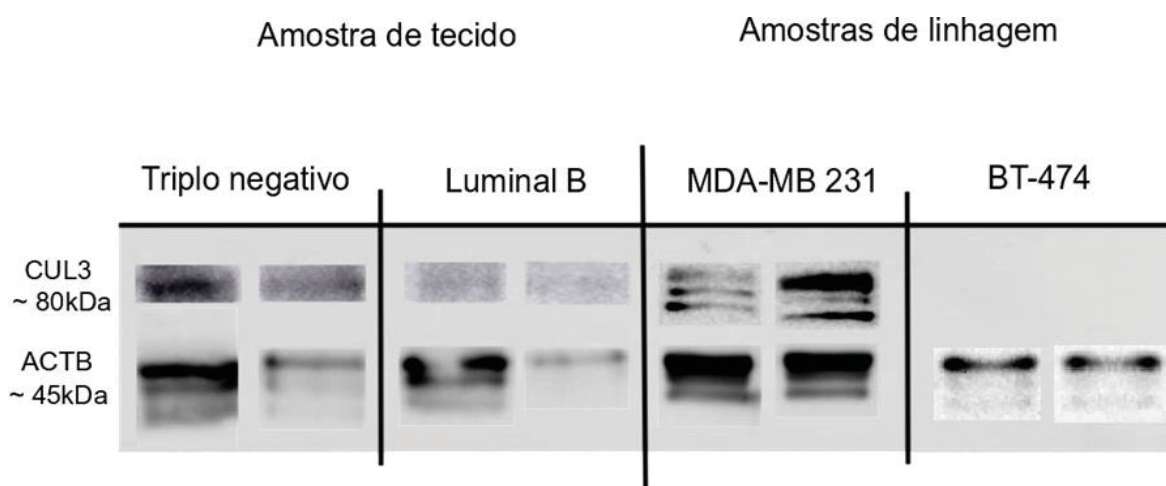
Através de diferentes métodos de análise, neste estudo observou-se baixa expressão de FN1 (FC de log2) em tumores caracteristicamente agressivos, como o TN. Nesse sentido, WU (2015) demonstrou que o receptor relacionado ao estrogênio  $\alpha$  pode se ligar diretamente ao promotor de FN1, promovendo o aumento da expressão dessa proteína. Tumores TN não expressam receptores de estrogênio, o que pode estar relacionado aos baixos níveis de FN1 nesses tumores. Estudos adicionais são necessários para uma melhor compreensão da relação entre tumores TN e a expressão diferencial de FN1, bem como de seu impacto na biologia deste subtipo tumoral.

De acordo com os dados obtidos nas anotações funcionais, essa proteína está envolvida em processos importantes na tumorigênese, incluindo o crescimento de células, e quando associada à COL1 forma uma rede fibrilar especial associada à invasão no tecido tumoral, estruturas que denominamos canais tubulares para invasão (KAARIANEN et al., 2006), o que indica a relevância de ampliar os conhecimentos acerca dos aspectos funcionais de FN1 em tumores de mama TN.

#### 6.4.3 Avaliação da expressão de Culina 3 em tumores TN e LB

A proteína CUL3 foi observada com aumento de expressão superior a 1,5 FC de log2 no tumor primário de mama do subtipo TN em relação ao LB, de acordo com a análise proteômica por espectrometria de massas. A figura 11 e o gráfico 3 indicam a expressão diferencial da proteína CUL3 nestes subtipos tumorais, utilizando extratos proteicos de tecidos, para linhagens é necessário confirmar sua expressão nas mesmas linhagens utilizadas para as demais proteínas, os géis são apresentados no apêndice 8.

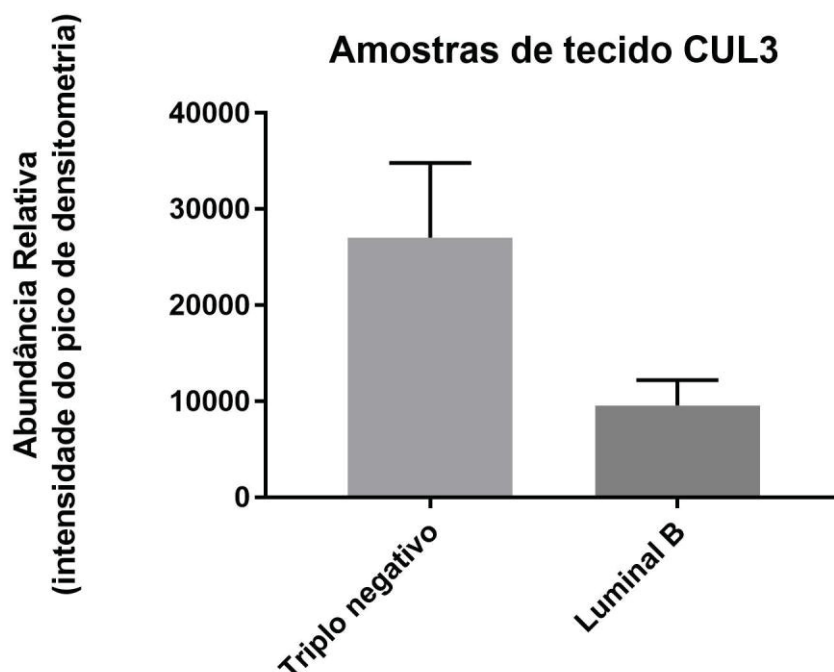
FIGURA 11 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CULINA 3 EM TECIDOS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL E LINHAGENS DO SUBTIPO TRIPLO NEGATIVO



NOTA: Gel com marcação de Culina 3 ~80kDa e controle de  $\beta$ - actina em ~45kDa. As linhagens MDA-MB-231 e BT-474 pertencem aos subtipos tumorais triplo negativo e luminal B, respectivamente.

FONTE: O Autor (2020)

GRÁFICO 3 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DA PROTEÍNA CULINA 3 EM TECIDOS TUMORAIS DOS SUBTIPOS TRIPLO NEGATIVO E LUMINAL



NOTA: A intensidade da banda foi normalizada pela expressão do controle realizado com  $\beta$ -actina. As análises foram realizadas utilizando as duas bandas das amostras de tecido para quantificar e comparar a abundância relativa entre os subtipos, análises obtidas utilizando o programa ImageJ.

FONTE: O Autor (2020)

A análise prévia de CUL3 corrobora com os dados obtidos na espectrometria de massas, evidenciando a maior expressão dessa proteína em tumores TN, sendo cerca de 0,6 FC de log2 maior nesse subtipo. Essa observação é condizente com Zhang (2012) onde CUL3 superexpresso desregula células no câncer de mama e rim, sugerindo um papel supressor de tumor. CUL3 não foi detectada na linhagem BT-474 (LB) com as ferramentas disponíveis, possivelmente devida a sua baixa expressão em linhagem Luminal B.

Hou (2015) descreveu a superexpressão de CUL3 no câncer de mama e sua superexpressão foi significativamente correlacionada com metástases à distância. A superexpressão de CUL3 foi associada à diminuição da sobrevida global dos pacientes com câncer de mama e induziu proliferação, TEM, migração, invasão *in vitro* e capacidades tumorigênicas e metastáticas aprimoradas *in vivo*. Loignon et al., (2009) realizou um estudo com

superexpressão de CUL3 em linhagens MCF-7, utilizando RNA's de interferência para avaliar a expressão dessa proteína em células de câncer de mama.

Thomas et al. (2017) avaliou a expressão de CUL3 e verificou baixos níveis em tecidos benignos e altos níveis em CDI do subtipo TN. Neste contexto, os dados observados no presente estudo são condizentes com o aumento de expressão conforme a agressividade do tumor.

CUL3 foi relacionada a diversos aspectos de relevância no câncer, como funções da tumorigênese (LOIGNON et al., 2009, HOU et al., 2015), Cul3 foi identificada para ser a ubiquitina ligase E3 para alguns membros da família Rho, pequenas GTPases, sendo demonstrado que RhoBTB2 é um substrato do complexo Cul3 ubiquitina ligase de mamífero. Isso sugere que o RhoBTB2 funciona como um supressor de tumor ligando e recrutamento de proteínas do complexo Cul3 ubiquitina ligase degradação. Portanto, a perda de RhoBTB2 levaria à regulação positiva de proteínas envolvido em oncogênese, amostras e linhas celulares de câncer gástrico e da bexiga, demonstram uma alta taxa de perda de heterozigosidade de RhoBTB2, indicando seu papel geral na carcinogênese (WILKINS (2004), DEL PULGAR et al., (2005), DING et al., (2011)), e sua expressão diferencial pode ter função na biologia de tumores TN. Neste sentido, recomenda-se ampliar a avaliação de sua expressão nesse subtipo tumoral, além de análises adicionais que permitam a compreensão e suas funções no câncer de mama TN.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta uma comparação entre tecidos tumorais de subtipos distintos de câncer de mama, sendo o Triplo Negativo o mais agressivo e com maior índice de recidiva e mortalidade quando comparado aos demais subtipos da doença.

- Os subtipos TN e LB apresentam diferenças moleculares, inclusive a nível proteômico.
- Foram identificadas 22 proteínas com diferença de expressão significativa sendo superexpressas ou subexpressas em 0,58 vezes ou mais.
- As análises funcionais das proteínas demonstraram um parâmetro de vias de ação relacionados a *hallmarks* bem descrito para o câncer. As proteínas apresentadas desenharam um quadro específico para essas amostras, onde as proteínas eleitas (CTNNB1, FN1 e CUL3) para validação demonstram uma relação com invasão, migração e metástase, características predominantes em cânceres invasivos como o Triplo Negativo.
- Este estudo demonstrou a relevância para a busca por biomarcadores para auxílio da terapia e diagnóstico do câncer de mama Triplo Negativo, utilizando a expressão proteica e gerando dados para interações das três proteínas e sua relação com funções biológicas no câncer de mama e sua posterior validação no tecido e em linhagens celulares dos subtipos TN e LB.

## **8. PERSPECTIVAS**

A perspectiva para esse trabalho é relacionar as interações envolvidas e caracterizar a diferença do microambiente tumoral entre esses subtipos, visando contribuir para futuras análises proteômicas.

- Realização de Co-imunoprecipitação para compreensão do microambiente de interação das 22 proteínas.
- Análises comparativas dos interatomos das 22 proteínas.
- Validação das demais proteínas listadas nesse estudo.
- Estudos adicionais que permitam compreender o significado biológico do proteoma diferencial obtido e sua relevância em tumores TN.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. D., CLAFFEY, K. P., WHITE B.A. Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. **Endocrinology** **150**: 14-23, 2009.
- ANASTAS, J. N., E MOON, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews Cancer**, 2013.
- ASHBURNER, M. BALL, CA. BLAKE, JA. BOTSTEIN, BUTLER, D. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics** volume 25, pages25–29 (2000) - nature.com
- BARBOSA, E., B., VIDOTTO, A., POLACHINI, G., M., HENRIQUE, T., MARQUI, A., B., T., TAJARA, E., H., Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Rev Assoc Med Bras** 2012; 58:366-375. 2012
- BAUER, K., R., BROWN, M., PARISE, C., A., CAGGIANO, V., Descriptive analysis of estrogen receptor (ER) – negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. **American Cancer Society** 2007
- BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONÇALVES, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 5, p. 1772-1786, 2006.
- BENAUD, C. M., RB DICKSON, R. B. Regulation of the expression of c-Myc by  $\beta$ 1 integrins in epithelial cells - **Oncogene**, 2001
- BURNETTE, W. N. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, Volume 112, Issue 2, Pages 195-203, April 1981.
- BURTET, J. Fatores preditores de positividade do linfonodo sentinela em pacientes com neoplasia maligna da mama. **[dissertação] Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre**, 2014.
- CAMPOS CZ, GUEMBAROVSKI R. L, OLIVEIRA CEC, BANIN HIRATA BK, VITIELLO GAF, DIAS FL, HIROKI CH, WATANABE MAE, MAZZUCO TL. Deleções de glutatona S-transferases podem atuar como prognóstico e marcadores terapêuticos no câncer de mama. **Clin Exp Med**. 2018 fev; 18 (1): 27-35.)
- CANUTO, G. A. B., COSTA, J. L., CRUZA, P. L., SOUZA, A. R. L., FACCIO, A. T., KLASSEN, A., RODRIGUES, K. T., TAVARES, M. F. M. Metabolômica: Definições, Estado-Da-Arte E Aplicações Representativas. **Quim. Nova**, Vol. 41, No. 1, 75-91, 2018

CARMO, P., O., LEITE, I., C., G., GUERRA, M., R., Survival of women with breast cancer luminal subtype, assisted in Juiz de Fora, MG. **Rev Bras Mastologia**. 2016

CAROTENUTO P., ROMA C., RACHIGLIO A. M., BOTTI G., ALESSIO A., NORMANNO N., Triple Negative Breast Cancer: From Molecular Portrait to Therapeutic Intervention. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression** 2019

CARVALHO, C. R.H, Análise da sobrevida livre de doença após quimioterapia neoadjuvante em mulheres com câncer de mama [dissertação] **UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA**, 2019.

CHAIRATVIT, K., & NGAMKITIDECHAKUL, C. Control of cell proliferation via elevated NEDD8 conjugation in oral squamous cell carcinoma. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 306(1-2), 163–169 2007

CHAMMAS, R. Biologia do Câncer: uma Breve Introdução. **Tratado de oncologia**, 2013

CHANDRIANI S, FRENGEN E, COWLING VH, et al. A core MYC gene expression signature is prominent in basal-like breast cancer but only partially overlaps the core serum response. **PloS one** 2009.

CHEN, H., XU, C., JIN, Q., LIU, Z. S100 protein family in human cancer. **American Journal of cancer** 89-115, 2014.

CHEN, X., LIU, X., LANG, H., ZHANG, S., LUO, Y., & ZHANG, J. S100 Calcium-Binding Protein A6 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition through  $\beta$ -Catenin in Pancreatic Cancer Cell Line. **PLOS ONE**, 10(3), 2015

CHEN, G., ZHANG, H., SUN, L., JIANG, Y., XU, Z., GU, H., XU, H., LIU, C., Prognostic significance of GSTP1 in patients with triple negative breast cancer. **Oncotarget**. Aug 2 2017

CHENG F, HE R, ZHANG L, LI H, ZHANG W, JI X.Expression of neddylation-related proteins in melanoma cell lines and the effect of neddylation on melanoma proliferation. **Oncol Lett** 2014

CHIAROTTO, J. A., AKBARALI, R., BELLOTTI, L. A structured group exercise program for patients with metastatic cancer receiving chemotherapy and CTNNB1 ( $\beta$ -catenin) as a biomarker of exercise efficacy - **Cancer management** 2017

CHICHE, A., MOUMEN, M., ROMAGNOLI, M., PETIT, V., LASLA, H., JÉZÉQUEL, P., FARALDO, M. M. p53 deficiency induces cancer stem cell pool expansion in a mouse model of triple-negative breast tumors **Oncogene** volume 36, pages2355–2365(2017)

CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R.C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **Lancet Oncology**, v.8, p.235-244, 2007



CLEVERS H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell** 127: 469–480 (2006).

CRAENE BD, BERX G. Redes reguladoras que definem TEM durante o início e a progressão do câncer. **Nat Rev Cancer**. (2013)

CROCE C. M., Oncogenes and câncer. *Journal Medicin*, 2008 Jan 31;358

CURTIN J. C., LORENZI M. V., Abordagens de descoberta de drogas para direcionar a sinalização Wnt em células tronco cancerosa. **Oncotarget** 2010; 1: 552 - 566.

DANG CV. MYC on the path to cancer. **Cell** 2012;149:22–35.

DEL PULGAR, T. G., BENITAH, S. A., VALERÓN, P. F., ESPINA, C., LACAL, J. C. Rho GTPase expression in tumorigenesis: Evidence for a significant link. **BioEssays**, 27(6), 602–613 2005

DEY, N., BARWICK, B. G., MORENO, C. S., ORDANIC-KODANI, M., CHEN, Z., OPREA-ILIES, G., LEYLAND-JONES, B. R. (2013). Wnt signaling in triple negative breast cancer is associated with metastasis. **BMC Cancer**, 13(1) (2013).

DING, F., YIN, Z., & WANG, H.-R. Ubiquitination in Rho Signaling. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 11(23), 2879–2887 2011

DJUKIC TI, SAVIC-RADOJEVIC AR, PEKMEZOVIC TD, MATIC MG, et al. Glutathione S-transferase T1, O1 and O2 polymorphisms are associated with survival in muscle invasive bladder cancer patients. **PLoS One** 8 (2013): e74724.

DUGGAN C, BALLARD-BARBASH R, BAUMGARTNER RN, BAUMGARTNER KB, et al. Associations between null mutations in GSTT1 and GSTM1, the GSTP1 Ile(105)Val polymorphism, and mortality in breast cancer survivors. **Springerplus** 2 (2013): 450.

EL WAKIL A., LALLI E., The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and câncer. *Molecular Cell Endocrinol* 2011

ERICKSON, H., P. Alongamento de fibronectina.J. Muscle **Res. Cell Motil.** 23:575–580 2002

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews: Cancer, London*, v. 4, p. 143 -153, 2004.

FENG Y., SPEZIA M., HUANG S., YUAN C., ZENG Z., ZHANG L., Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases** Volume 5, Issue 2, June 2018, Pages 77-106.

FKIH M'HAMED, I., PRIVAT, M., PONELLE, F., PENAULT-LLORCA, F., KENANI, A., BIGNON, Y.-J. Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and

miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, 2015

FUKATA, M., KAIBUCHI, K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, pp. 887-897 2001.

GENAU, H. M., HUBER, J., BASCHIERI, F., AKUTSU, M., DÖTSCH, V., FARHAN, H., BEHREND, C. CUL3-KBTBD6/KBTBD7 Ubiquitin Ligase Cooperates with GABARAP Proteins to Spatially Restrict TIAM1-RAC1 Signaling. **Molecular Cell**, 57(6), 995–1010 2015.

GENSCHIK P, SUMARA I, LECHNER E. A família emergente de ligas de ubiquitina CULLIN3-RING (CRL3s): funções celulares e implicações da doença. **The daily EMBO**. 2013; 32: 2307–20.

GEYER F. C, LACROIX - TRIKI M, SAVAGE K, et al. A ativação da via de  $\beta$  - catenina no câncer de mama está associada ao fenótipo triplo negativo, mas não à mutação CTNNB1. **Mod Pathol** 2011; 24: 209 - 231.

GIUSSANI, M., MERLINO, G., CAPPELLETTI, V., TAGLIABUE, E., & DAIDONE, M. G. Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression. *Seminars in Cancer Biology* 2015, 35, 3–10

GOBBI H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **J Bras Patol e Med Lab** 2012;48(6):463–74.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W.C.; COATES, A.S.; GELBER, R.D.; THURLIMANN, B.; SEEN, H.J. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Annal of Oncology**, v. 22, p.1736-1747, 2011.

GOMIG, T. H. B., Análise do proteoma de tecido mamário não tumoral contralateral e comparação com o do tumor primário correspondente [Dissertação] **Universidade Federal do Paraná**, 2015.

GOMIG, T. H. B., Análise proteômica comparativa no câncer de mama: predição de vias e funções biológicas e de interações proteicas baseada em espectrometria de massa e análises de bioinformática. [Tese] **Universidade Federal do Paraná**, 2019.

GOMIG THB, CAVALLI IJ, SOUZA RLR, et al. Quantitative label-free mass spectrometry using contralateral and adjacent breast tissues reveal differentially expressed proteins and their predicted impacts on pathways and cellular functions in breast cancer. **J Proteomics**, 2019

GROMOVA I., GROMOV P., HONMA N., KUMAR S., RIMM D., TALMAN M. M., WIELENG V. T., MOREIRA J. M. High level PHGDH expression. In breast

câncer is prodominantly associated with keratin 5-positive cell lineage independently of malignancy. **Molecular Oncology**. 2015.

GUEMBAROVSKI, R. L., LOPES, L. F., ALMEIDA, F. C., ISHIBAYASHI, C. M., HIROKI, C. H., WATANABE, A. E. Análise da expressão da proteína FOXP3 no microambiente tumoral de pacientes portadoras de câncer de mama subtipo triplo negativo. **BioSaúde** 2013.

GUNASINGHE, N.P.A.D.; WELLS, A.; THOMPSON, E.W.; HUGO, H.J. Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. **Cancer Metastasis Rev**, 2012.

GWAK, J. M., KIM, H. J., KIM, E. J., CHUNG, Y. R., YUN, S., SEO, A. N., ... PARK, S. Y. MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell phenotype, and tumor progression in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, 147(1), 39–49 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HE TC, SPARKS AB, RAGO C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. **Science** 1998; 281:1509–1512.

HERSCHKOWITZ J., SIMIN K., WEIGMAN V., MIKAELIAN I., USARY J., HU Z., RASMUSSEN K., JONES L., ASSEFNIA S., CHANDRASEKHARAN S., BACKLUND M., YIN Y., KHRAMTSOV A., BASTEIN R., QUACKENBUSH J., GLAZER R., BROWN P., GREEN J., KOPELOVICH L., FURTH P., PALAZZO J., OLOPADE O., BERNARD P., CHURCHILL G., VAN DYKE T., PEROU C. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**. 8. 2007

HON GC, HAWKINS RD, CABALLERO OL, et al. Hipometilação global de DNA acoplada à formação repressiva de domínio de cromatina e silenciamento gênico em câncer de mama. **Genoma Res**. 2012; 22

HUO, X., LI, S., SHI, T., SUO, A., RUAN, Z., GUO, H., YAO, Y. Cullin3 promotes breast cancer cells metastasis and epithelial-mesenchymal transition by targeting BRMS1 for degradation. **Oncotarget** 2015 Vol. 6, No. 39

HUANG, M., SHEN, A., DING, J., MEIYU, G., Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. **Trends in Pharmacological sciences** 2014

**INGENUITY PATHWAY ANALYSIS** Acesso: <http://www.ingenuity.com> 2019.

**INGENUITY TARGET EXPLORER**, Acesso: <  
<https://targetexplorer.ingenuity.com/index.htm>> 2019.

**INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER INCA**. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **TNM: classificação de tumores malignos** / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004.

**INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER INCA.** Disponível em <  
<https://www.inca.gov.br/exposicoes/mulher-e-o-cancer-de-mama-no-brasil>>  
 Acessado dia 05/02/2020

JACQUEMIER, J., GINESTIER, C., ROUGEMONT, J., BARDOU, V., J., et.al  
 Protein Expression Profiling Identifies Subclasses of Breast Cancer and  
 Predicts Prognosis **American Association for Cancer Research** Vol. 65 2005

JAFFE, A. B., HALL, A. Rho GTPase: biochemistry and biology. **Annu Revist  
 Cell Dev. Biology** 2005, 247-269.

JIA L, SUN Y. SCF E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. **Curr Cancer  
 Drug Targets** 2011

KAARIAINEN E , NUMMELA P , SOIKKELI J , YIN M , LUKK  
 M, JAHKOLA T, VIROLAINEN S, ORA A, UKKONEN E, SAKSELA O, HOLT  
 TA E. Amudança para uma fase invasiva de crescimento no melanoma está  
 associada à tenascina-C, fibronectina e procolágeno-I formando estruturas de  
 canais específicos para invasão. **JOURNAL Pathol** , ( 2006 ) , pp. 181 – 191

KAP EJ, RICHTER S, RUDOLPH A, JANSEN L, et al. Genetic variants in the  
 glutathione S-transferase genes and survival in colorectal cancer patients after  
 chemotherapy and differences according to treatment with oxaliplatin.  
**Pharmacogenet. Genomics** (2014).: 340-347.

KHRAMTSOV AI, KHRAMTSOVA GF, TRETIKOVA M, HUO D, OLOPADE  
 OI, et al. Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast  
 cancers and predicts poor outcome. **J Pathol** 176: 2911–2920. (2010)

KLAJIC, J., KRISTENSEN, V., Mecanismos epigenéticos em cancer, **tradução  
 epigenética**, 2018, Pág. 141-168.

KLAUS A, BIRCHMEIER W., SASAGURI T. The Wnt/beta-catenin signaling  
 pathway as a target in drug Discovery. **Journal Pharmacol Science** 2007

KONDO N, TOYAMA T, SUGIURA H, FUJII Y AND YAMASHITA H: miR-206  
 expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast  
 cancer. **Cancer Res.** 5004-5008, 2008.

LAM, S.W, JIMENEZ, C.R, BOVEN, E. Breast cancer classification by  
 proteomic technologies: Current state of knowledge. **Cancer Treatment  
 Reviews**, 2013.

LANÇAS, F., M., A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de  
 Massas: finalmente “compatíveis”? **Ciência Cromatografia**, 2009

LEHMANN, B.D.; BAUER, J. A.; CHEN, X.; SANDERS, M. E.;  
 CHAKRAVARTHY, B.; SHYR, Y.; PIETENPOL, J.A. Identification of human  
 triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of  
 targeted therapies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121(7), p. 2750-  
 2767, 2011.

LEE, A. Glutathione S-transferases (GSTs) polymorphism and taxane (docetaxel) sensitivity in breast cancer. **Translational Cancer Research**, agosto de 2019

LEE, W. J., CHEN, W. K., WANG, C. J., LIN, W. L., TSENG, T. H. Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and  $\beta$ 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 226(2), 178–191 2008.

LIBERZON, A. BIRGER, THORVALDSDÓTTIR, C. GHANDI, H. JILL M. MESIROV, P. The Molecular Signatures Database Coleção de conjuntos de genes Hallmark. **Cell Systems** Volume 1, edição 6, 23 de dezembro de 2015, páginas 417-425.

LIN, S.Y., XIA, W., WANG, J. C., KWONG, K. Y., SPOHN, B., WEN, Y., HUNG, M.C. Beta -Catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97(8), (2000).

LIN, J. H., TU, S. H., CHEN, L. C. et al. Oestrogen receptor-regulated glutathione S-transferase mu 3 expression attenuates hydrogen peroxide-induced cytotoxicity, which confers tamoxifen resistance on breast cancer cells **Breast Cancer Res Treat** (2018) 172: 45.

LIU, X., MA, Y., YANG, W., WU, X., JIANG, L., CHEN, X. Potential Therapeutic Targets For Breast Cancer. **Molecular Medicine Reports** 12: 1789-1795, 2015

LIU, Z.-C., NING, F., WANG, H.-F., CHEN, D.-Y., CAI, Y.-N., SHENG, H.-Y., DU, J. Epidermal growth factor and tumor necrosis factor  $\alpha$  cooperatively promote the motility of hepatocellular carcinoma cell lines via synergistic induction of fibronectin by NF- $\kappa$ B/p65. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1861(11), 2568–2582 2017

LOCASALE, J., W. E CANTLEY, L., C. Genetic selection for enhanced serine metabolism in cancer development, **Cell Cycle**, 10:22, 3812-3813 2011.

LOIGNON, M., MIAO, W., HU, L., BIER, A., BISMAR, T. A., SCRIVENS, P. J., BATIST, G. Cul3 overexpression depletes Nrf2 in breast cancer and is associated with sensitivity to carcinogens, to oxidative stress, and to chemotherapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, 8(8) 2009

LOUIE, S. M., GROSSMAN, E. A., CRAWFORD, L. A., DING, L., CAMARDA, R., HUFFMAN, T. R., NOMURA, D. K. GSTP1 Is a Driver of Triple-Negative Breast Cancer Cell Metabolism and Pathogenicity. **Cell Chemical Biology**, 23(5), 567–578 2016.

LUO, X. G., et al Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated MYL9 transactivation and MCF-7 breast cancer cell migration. **Letters about cancer**, 2014

MA, C. X., ELLIS, M. J., PIWNICA-WORMS, H. Targeting Chk1 in p53-deficient triple-negative breast cancer is therapeutically beneficial in human-in-mouse tumor models. **J Clin Invest.** 2012

MACGROGAN, G.; DE MASCAREL I, SIERANKOWSKI G, MAURIAC L, DEBLED M, DURAND M, DE LARA CT, AVRIL A, PICOT V, MATHOULIN-PÉLISSIER S. Time for reappraisal of progesterone-receptor testing in breast cancer management. **J Clin Oncol.** 2005 Apr.

MAHMOOD, T., YANG, P., C., Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences.** 2012 Sep;4(9):429-34.

MARCHIÒ, C. REIS-FILHO, J.S. **Hereditary breast cancer: from molecular pathology to tailored therapies.** Molecular Pathology Laboratory, The Breakthrough Breast Cancer Research Centre, Institute of Cancer Research, London, UK 2008.

MATSUDA Y, SCHLANGE T, OAKELEY EJ, BOULAY A, HYNES NE. WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth. **Breast Cancer Res.** 2009;11(3):R32

MUHAMMAD, A. H., WICHA, M. S. et. al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **PNAS** April, 2003.

MUELLER C., HAYMOND A., DAVIS J. B., WILLIAMS A, ESPINA V., Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. **Expert Rev Proteomics.** 2018 Feb;15(2):131-152.

MUTLU P., URAL A. U., GUNDUZ U. Differential gene expression analysis related to extracellular matrix components in drug-resistant RPMI-8226 cell line. **Biomed Pharmacother** 66: 228-231, 2012

NAKAI, K., XIA, W., LIAO, HW. et al. The role of PRMT1 in EGFR methylation and signaling in MDA MB468 triple negative breast cancer cells. **Sociedade Japonesa do Câncer de Mama** 2018.

OHASHI, T., DP KIEHART, D., P., E HP ERICKSON, H., P. Marcação dupla da matriz de fibronectina e citoesqueleto de actina com variantes de proteínas fluorescentes verdes. **J. Cell Sci.** 115:1221–1229 2002

OLIVEIRA, N. C. S., Análise proteômica comparativa do carcinoma mamário lobular e ductal. [dissertação]. **Universidade Federal do Paraná**, 2011.

**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE OMS.** Disponível em <  
<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>>  
Acessado 05/02/20.

O'SHAUGHNESSY J., OSBORNE C., PIPPEN J. E., YOFFE M., PATT D., ROCHA C., CHOU KOO I., SHERMAN B. M., BRADLEY C., Iniparib Plus



Chemotherapy In Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. **The New England Journal Of Medicine**. January 20, 2011

PENG X., GONG F. M., REN M., AI P., WU S., TANG J., HU X., Proteomic analysis of docetaxel resistance in human nasopharyngeal carcinoma cells using the two-dimensional gel eletrophoresis method. **Wolters Kluwer Health**, 2016

PEREIRA, A. L. A., VERAS, S. S. L., SILVEIRA, É. J. D., SEABRA, F. R. G., PINTO, L. P., SOUZA, L. B., & FREITAS, R. A. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, 71(1), 81–86 2005.

PÉREZ-LÓPEZ, F. R.; CHEDRAUI, P.; HAYA, J. Vitamin D acquisition and breast cancer risk. **Reproductive Sciences**, v. 16, p. 7-19, 2009.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L.A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LONNING, P. E.; BORRESENDALE, A.L.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. **Molecular portraits of human breast tumors**. Nature, v.406, p.747-752, 2000.

POLYAK K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest**. 2007; 117:3155-63

POSSEMATO, R., MARKS, K. M., SHAUL, Y. D., PACOLD, M. E., KIM, D., BIRSOY, K., SABATINI, D. M. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. **Nature**, 476(7360), 346–350 2011.

PRASAD CP, GUPTA SD, RATH G, RALHAN R (2007) Wnt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between beta-catenin, dishevelled and cyclin D1 expression. **Oncology** 73: 112–117. 13. (2007)

PRAT, A., PARKER J., KARGINOVA O., FAN C., LIVASY C., HERSCHKOWITZ J., HE X., PEROU C. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**. 12. 2010.

PROSPERI J.R., GOSS K. H. Visando a via Wnt / beta-catenina no câncer de mama. **Curr Drug Targets** 2010; 11: 1074 - 1088.

**QIAGEN** Inc.,  
<<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuitypathway-analysis>>

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Basal-like breast cancer: a critical review. **J Clin Onco**, v. 26, n. 15, p. 2568-2581, 2008.

RAKHA, E. A.; ELSHEIKH, S. E.; ALESKANDARANY, M. A.; HABASHI, H. O.; GREEN, A. R.; POWE, D. G.; EL-SAYED, M. E.; BENHASOUNA, A.; BRUNET, J.; AKSLEN, L. A.; EVANS, A. J.; BLAMEY, R.; REIS-FILHO, J. S.; FOULKES,

W. D.; ELLIS, I. O. Triple-Negative Breast Cancer: Distinguishing between Basal and Nonbasal Subtypes. **Clin Cancer Res**, v. 15, p. 2302-2310, 2009.

RAMIS-CONDE, I., DRASDO, D., ANDERSON, A. R. A., & CHAPLAIN, M. A. J. Modeling the Influence of the E-Cadherin- $\beta$ -Catenin Pathway in Cancer Cell Invasion: A Multiscale Approach. **Biophysical Journal**, 95(1), 155–165 (2008).

REIS-FILHO, J.S.; TUTT, A.N. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52, p.108-118, 2008.

REIS-FILHO JS, PUSZTAI L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet**. 2011; 378:1812–23.

RESENDE, U. Fatores prognósticos e preditivos da resposta clínica e patológica em mulheres com carcinoma de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante. [tese] **Universidade Estadual de Campinas**, Faculdade de Ciências Médicas, 2018.

RIDLEY, A. Rho GTPases. Integrating integrin signaling. **J. Cell Biol.**, 150 2000.

ROUZIER,R.; PEROU,C.M.; SYMMANS,W.F.; IBRAHIM,N.; CRISTOFANILLI M, ANDERSON,K.; HESS,K.R.; STEC, J.; AYERS,M.; WAGNER,P.; MORANDI P, FAN, C.; RABIUL, I.; ROSS, J.S.; HORTOBAGYI, G.N.; PUSZTAI, L.; Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res**. 11(16):5678-85 2005.

RUIZ-GARCIA, E., SCOTT, V., MACHAVOINE, C., BIDART, J. M. Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening. **Journal of cancer**, 2010

SANTOS P.M., TEIXEIRA M.C., SÁ-CORREA I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. Lisboa: **Boletim de Biotecnologia**; 2004.

SAPONARO, SCARPI, ZITO, GIOTTA, SILVESTRIS, & MANGIA. Independent Negative Prognostic Role of TCF1 Expression within the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Primary Breast Cancer Patients. **Cancers**, 2019 11(7),

SAVINO, R.; PADUANO, S.; PREIANÒ, M.; TERRACCIANO, R. The Proteomics Big Challenge For Biomarkers And New Drug-Targets Discovery. **International Journal Of Molecular Sciences**, V. 13, P. 13926- 13948, 2012

SCARFF, R.; TORLONI, F. Histological typing of breast tumors. International histological classification of tumors. **World Health Organization**, Geneva, v.2, p.20, 1968.

SCHORR, M. C.; PEDRINI, J. L.; REGINATTO, A. G. Uma nova plataforma terapêutica para o câncer de mama: a evolução do tratamento sistêmico neoadjuvante. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 25, n. 1, p. 20–25, 2015.



SEDAGHAT F, Família de proteínas Notopoulos A: S100 e sua aplicação na prática clínica. **Hippokratia**. 2008, 12: 198-204.

SHAH, S. N., COPE, L., POH, W., BELTON, A., ROY, S. HMGA1: a master regulator of tumor progression in triple-negative breast cancer cells - **PloS one**, 2013

SHTUTMAN M., ZHURINSKY J., SIMCHA I., et al. O gene da ciclina D1 é um alvo da via beta - catenina / LEF - 1. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96: 5522 - 5527.

SOIKKELI, J., PODLASZ, P., YIN, M., NUMMELA, P., JAHKOLA, T., VIROLAINEN, S., HÖLTÄ, E. Metastatic Outgrowth Encompasses COL-I, FN1, and POSTN Up-Regulation and Assembly to Fibrillar Networks Regulating Cell Adhesion, Migration, and Growth. **The American Journal of Pathology**, 177(1) 2010.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J.C.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D.; EYSTEIN LONNING, P.; BORRESEN-DALE, A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA**, v.98, p.10869-10874, 2001.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.; DENG, S.; JOHNSEN, H.; PESICH, R.; GEISLER, S.; DEMETER, J.; PEROU, C.M.; LONNING, P.E.; BROWN, P.O.; BORRESEN-DALE, A.L.; BOTSTEIN, D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 2003

SOSA, M. S., LOPEZ-HABER, C., YANG, C., WANG, H., LEMMON, M. A., BUSILLO, J. M., KAZANIETZ, M. G. Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an Essential Mediator of ErbB Signaling in Breast Cancer. **Molecular Cell**, 40(6), 877–892 2010.

SOUSA, K. S., Análise Proteômica Em Carcinomas Esporádicos Primários De Mama E Em Metástases De Linfonodos Axilares Correspondentes. [dissertação] **Universidade Federal do Paraná**, 2013.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal Of Molecular Biology** (1975) 98, 503-517

STEFFENS S, SCHRADER A, VETTER G, et al: Fibronectin 1 protein expression in clear cell renal cell carcinoma. **Oncologic Lett** 3: 787-790, 2012.

SUBRAMANIAN, A., TAMAYO, P., MOOTHA, V.K., MUKHERJEE, S., Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of de United States of America**, 2005.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutat Res**, v. 402, p. 7-14, 1998.

SUN, H.; GONG, S.; CARMODY, R. J.; HILLIARD, A.; LI, L.; SUN, J.; KONG, L.; XU, L.; HILLIARD, B.; HU, S. TIPE2, a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis. **Cell** 133:415–426; 2008.

SCARFF, R. & TORLONI, F. Histological typing of breast tumors. International histological classification of tumors. no 2. Geneva: World Health Organization, 1968

SZABO, Z.; SZOMOR, J.S.; FOELDI, I.; JANAKY, T. Mass Spectrometry-Based Label Free Quantification Of Gel Separated Proteins. **Journal Of Proteomics**, V. 75, P. 5544–5553, 2012.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 28 jan. 2015.

TAYLOR, I. W. LINDING, R. WARDE-FARLEY, D. et. al. Modularidade dinâmica em redes de interação de proteínas prediz prognóstico do câncer de mama. **Nature Biotechnology** volume 27 , páginas 199 - 204 (2009).

THOMAS, L. N., CHEDRAWE, E. R., BARNES, P. J., & TOO, C. K. L. Prolactin/androgen-inducible carboxypeptidase-D increases with nitrotyrosine and Ki67 for breast cancer progression in vivo, and upregulates progression markers VEGF-C and Runx2 in vitro. **Breast Cancer Research and Treatment**, 164(1), 27–40 (2017)

TIAN, T., LI, XI., HUA, Z., MA, J., LIU, Z., CHEN, H., CUI, Z. S100A1 promotes cell proliferation and migration and is associated with lymph node metastasis in ovarian cancer. **Discov Med**. Apr;23(127):235-245. 2017

TRIULZI, T., TAGLIABUE, E., BALSARI, A. E CASALINI, P. Expressão de FOXP3 em células tumorais e implicações para a progressão do câncer. **Jornal de Fisiologia Celular**, 228 (1), 30–35 2012

TYANOVA S, ALBRECHTSEN R, KRONQVIST P, COX J, MANN M, GEIGER T. Proteomic maps of breast cancer subtypes. **Nature communication** 2016, jan, 4.

VLADIMIR, K., BARKER, N.; Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. **Science**. **275** (5307) (1997).

VIEIRA, D.S.C.; DUFLOTH, R.M.; SCHMITT, F.C.L.; ZEFERINO, L.C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, nº 1, p. 42-47, 2007.

VEIGA A. Western Blot Introdução y Optimización (2013)

VREULS CP, OLDE DAMINK SW, KOEK GH, WINSTANLEY A, et al. Glutathione S-transferase M1-null genotype as risk factor for SOS in oxaliplatin-treated patients with metastatic colorectal cancer. **Br. J. Cancer**. 676-680 2013.

WANG, J. H., ZHANG, L., HUANG, S. T., XU, J., ZHOU, Y., YU, X. J., WEN, Z. S., JIA, W. H., ZHENG, M. Expression and prognostic significance of MYL9 in esophageal squamous cell carcinoma. **Plos One** 7 de abril de 2017.

WANG, K., REN, Y., LIU, Y., ZHANG, J., & HE, J. Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ -Induced Protein 8-like-2 (TIPE2) Inhibits Proliferation and Tumorigenesis in Breast Cancer Cells. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics** 25(1), 55–63 (2017)

WANG, Y., ZENG, J., WU, W. *et al.* Nicotinamide N-methyltransferase enhances chemoresistance in breast cancer through SIRT1 protein stabilization. **Breast Cancer Res** 21, 64 (2019)

WEINBERG, R. A. **A Biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

WILKINS, A. RhoBTB2 is a substrate of the mammalian Cul3 ubiquitin ligase complex. **Genes & Development**, 18(8), 856–861 2004

WILLIAMS, A. C., RAMSDEN, D. B., Homeostase da nicotinamida: uma via xenobiótica essencial para o desenvolvimento e doenças degenerativas. **Med Hipóteses**: 353–362 (2005).

WU, X., TU, X., JOENG, K. S., HILTON, M. J., WILLIAMS, D. A., LONG, F. Rac1 Activation Controls Nuclear Localization of  $\beta$ -catenin during Canonical Wnt Signaling. **Cell**, 133(2), 340–353 2008

XIA, M., LAND, H. Tumor supressor p53 restricts Ras stimulation of RhoA and câncer cell motility. **Nature Struct Molecular Biology** 2007. 215-223.

XIE C, WEI W, SUN Y. Role of SKP1-CUL1-F-box-protein (SCF) E3 ubiquitin ligases in skin cancer. **J Genet Genomics** 2013

XU, J., CHEN, Y., HUO, D., KHRAMTSOV, A., KHRAMTSOVA, G., ZHANG, C., OLOPADE, O. I.  $\beta$ -catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 2015 55(5), 431–439.

XU, W.H., LIU, Z.B., YANG, C., QIN, W., & SHAO, Z.-M. Expression of Dickkopf-1 and Beta-Catenin Related to the Prognosis of Breast Cancer Patients with Triple Negative Phenotype. **PLoS ONE**, 7(5), (2012).

YOON, J. H., EUN, J. W., CHOI, W. S., KIM, O., NAM, S. W., LEE, J. Y., E PARK, W. S. NKX6.3 Is a Transcription Factor for Wnt/ $\beta$ -catenin and Rho-GTPase Signaling-Related Genes to Suppress Gastric Cancer Progression. **EBioMedicine**, 9, 97–109. 2016

ZHANG G, LI G. Novel multiple markers to distinguish melanoma from dysplastic nevi. **PLoS ONE** 2012

ZHANG SL, MAO NF, SUN JY, SHI ZC, ET AL. Predictive potential of glutathione S-transferase polymorphisms for prognosis of osteosarcoma patients on chemotherapy. **Asian Pac. J. Cancer Prev.** 2705-2709 (2012).

ZHAO, H., SHEN, J., MEDICO, L., WANG, D., AMBROSONE C. B. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer PloS one, 2010

ZHOU, Z., QUTAISH, M., HAN, Z., SCHUR, R. M., LIU, Y. MRI detection of breast cancer micrometastases with a fibronectin-targeting contrast agente. **Nature** 2015

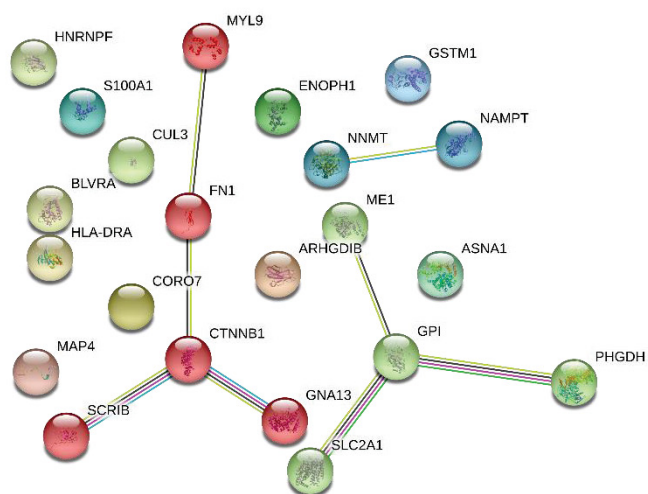
## APÊNDICES

### APÊNDICE 1. VIAS CANÔNICAS E A RELAÇÃO COM AS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS

<b>Vias Canônicas</b>	<b>(p-value)</b>	<b>Moléculas</b>
Sinalização de ILK	0.48	<i>FN1, MYH9, CTNNB1</i>
Sinalização de Metabolismo Xenobiotico	0.17	<i>CUL3, GSTM1</i>
Sinalização de Proteína Kinase A	0.10	<i>GNA13, CTNNB1</i>
Sinalização p53	0.00	<i>CTNNB1</i>
Sinalização PI3K/AKT	-0.03	<i>CTNNB1</i>
Sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina	-0.08	<i>CTNNB1</i>
Sinalização do citoesqueleto de actina	0.46	<i>FN1, MYH9, GNA13</i>
Sinalização epitelial da junção de Adherens	0.31	<i>MYH9, CTNNB1</i>
Sinalização de Junção Apertada	0.30	<i>MYH9, CTNNB1</i>
Remodelação de junções epiteliais de Adherens	0.08	<i>CTNNB1</i>
Regulação da Via Epitelial-Mesenquimal de Transição	-0.12	<i>CTNNB1</i>
Sinalização de Junções Gap	-0.14	<i>CTNNB1</i>
Mecanismos Moleculares do Câncer	0.10	<i>GNA13, CTNNB1</i>
Sinalização de Câncer de Tireoide	0.12	<i>CTNNB1</i>
Sinalização de carcinoma basal celular	0.07	<i>CTNNB1</i>
Sinalização do Câncer Endometrial	0.06	<i>CTNNB1</i>
Sinalização do câncer de próstata	0.00	<i>CTNNB1</i>
Sinalização do câncer de ovário	-0.06	<i>CTNNB1</i>
Sinalização multiforme de glioblastoma	-0.10	<i>CTNNB1</i>
Sinalização de metástase de câncer colorretal	-0.19	<i>CTNNB1</i>
Sinalização de Ephrin B	0.43	<i>GNA13, CTNNB1</i>
Sinalização de $\alpha$ 12/13	0.32	<i>GNA13, CTNNB1</i>
Resposta ao estresse oxidativo mediada por NRF2	0.26	<i>CUL3, GSTM1</i>
Via de sinalização de câncer FAT10	0.14	<i>CTNNB1</i>
Caminho de sinalização opióide	-0.18	<i>CTNNB1</i>

Fonte: IPA, O Autor 2020

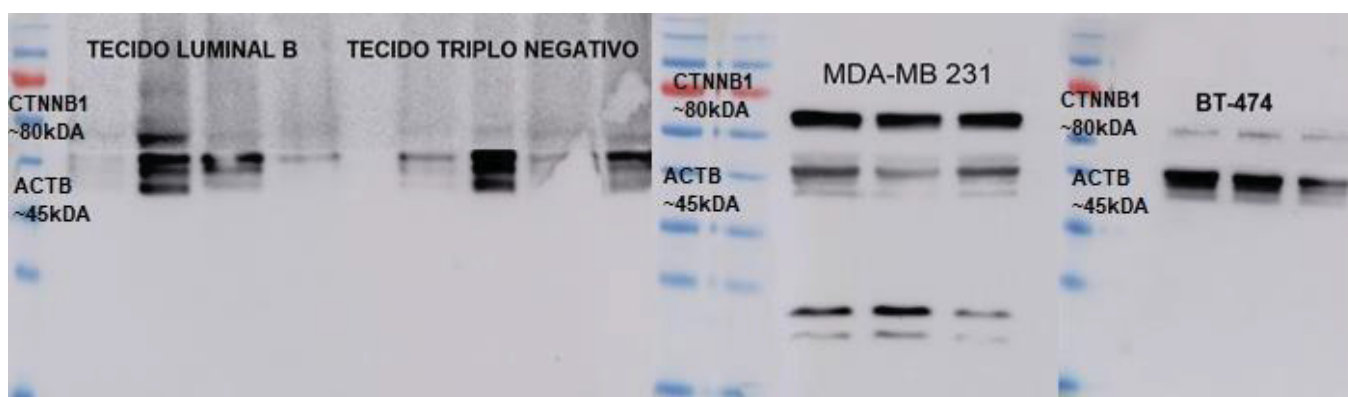
## APÊNDICE 2. FIGURA GERAL DAS 22 PROTEÍNAS REALIZADAS NO STRING



Legenda: Correlações realizadas no STRING: verde - relação genética, vermelho - fusões de genes, azul - co-ocorrência de genes, ciano - interações conhecidas em bancos de dados com curadoria, rosa - interações conhecidas determinado experimentalmente, amarelo - mineração de texto, preto- co-expressão e roxo - homologia proteica.

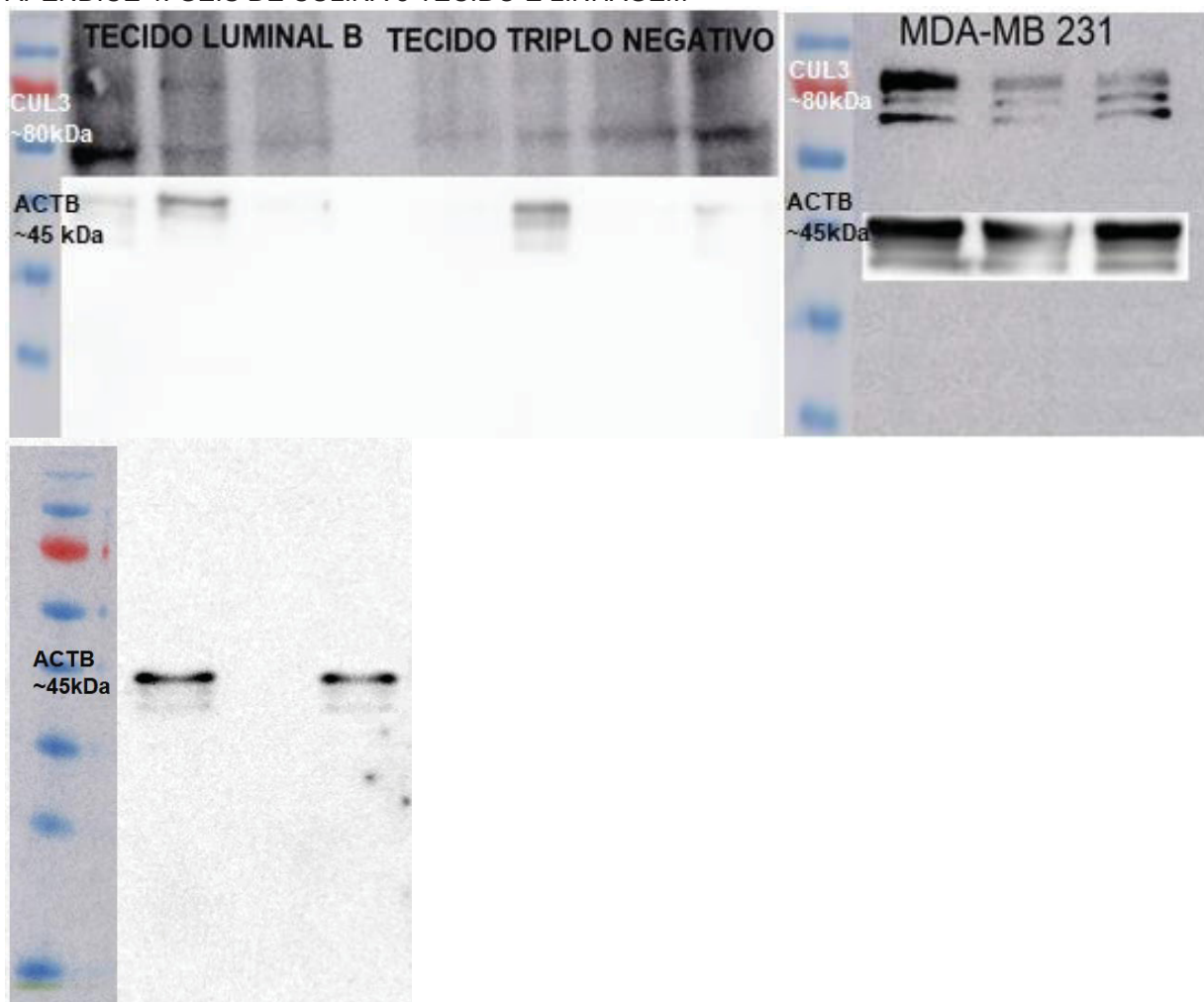
FONTE: O Autor (2020)

### APÊNDICE 3. GÉIS DE $\beta$ - CATENINA 1 TECIDO E LINHAGEM



LEGENDA: à esquerda gel com o tecido tumoral de Luminal B e Triplo Negativo, à direita amostras de linhagens MDA-MB-231 de Triplo Negativo e BT-474 de Luminal B  
O Autor (2020)

## APÊNDICE 4. GÊIS DE CULINA 3 TECIDO E LINHAGEM

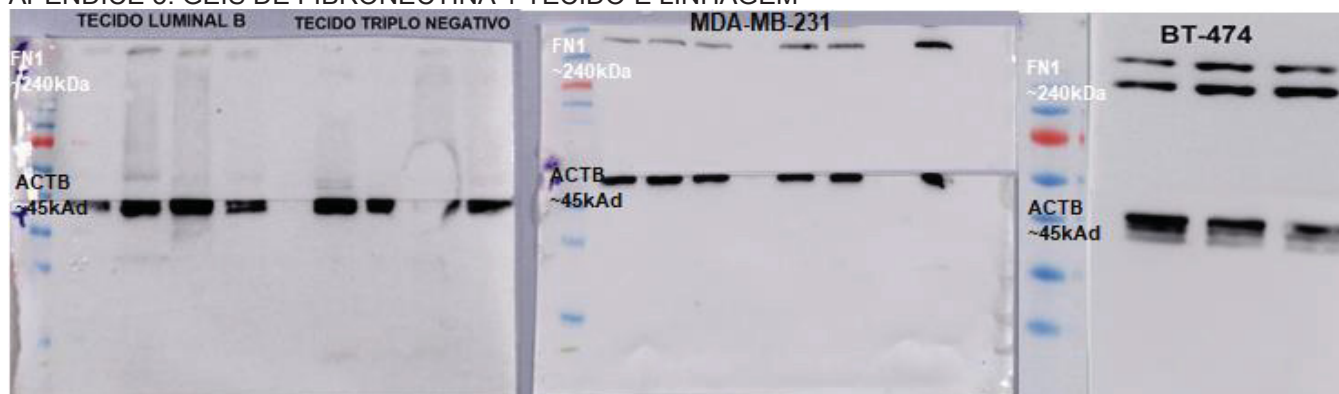


LEGENDA: à esquerda gel com o tecido tumoral de Luminal B e Triplo Negativo, à direita amostras de linhagens MDA-MB-231 de Triplo Negativo, CUL3 não detectada na linhagem de Luminal B.

O Autor 2020



## APÊNDICE 5. GÉIS DE FIBRONECTINA 1 TECIDO E LINHAGEM



LEGENDA: à esquerda gel com o tecido tumoral de Luminal B e Triplo Negativo, à direita amostras de linhagens MDA-MB-231 de Triplo Negativo e BT-474 de Luminal B  
O Autor 2020